



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁷ C07K 16/28; C12N 15/13; A61K 39/395; A61P 35/00 (13) B



(21) 1-2013-00814 (22) 23/08/2011
(86) PCT/US2011/048752 23/08/2011 (87) WO2012/027328 01/03/2012
(30) 61/375,999 23/08/2010 US; 61/380,827 08/09/2010 US
(45) 25/06/2020 387 (43) 25/10/2013 307A
(73) BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (US)
201 West 7th Street, Austin, TX 78701, United States of America
(72) LIU, Yong-Jun (US); VOO, Kui Shin (MY); BOVER, Laura (AR); TSURUSHITA,
Naoya (JP); TSO, J., Yun (US); KUMAR, Shankar (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG OX40 VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất các kháng thể của người, tốt hơn là các kháng thể người tái tổ hợp, cả ở dạng được làm giống người lẫn dạng khảm, mà liên kết đặc hiệu với OX40 của người. Các kháng thể được ưu tiên có ái lực cao đối với thụ thể OX40 và hoạt hóa thụ thể này in vitro và in vivo. Kháng thể có thể là kháng thể có chiều dài đầy đủ hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng. Các kháng thể, hoặc các phần kháng thể, có tác dụng điều biến hoạt tính thụ thể, ví dụ, ở đối tượng người bị rối loạn trong đó hoạt tính OX40 là có hại. Sáng chế còn đề xuất axit nucleic, vector và tế bào chủ để biểu hiện các kháng thể người tái tổ hợp, và các phương pháp tổng hợp các kháng thể người tái tổ hợp.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập chung đến quá trình điều biến sự hoạt hóa thụ thể OX40, và cụ thể hơn là đề cập đến việc điều biến thụ thể OX40 để ức chế chức năng kìm hãm miễn dịch của Intolokine 10 (IL-10) tạo ra tế bào T điều hoà $CD4^+$ typ 1 (“tế bào Tr1”) và tế bào T điều hoà biểu hiện Foxp3⁺ (đôi khi trong bản mô tả này gọi là tế bào “Foxp3⁺ T-reg”), và sự tạo thành tế bào Tr1 từ các tế bào $CD4^+$ hoặc các tế bào chưa qua thí nghiệm và sự sản xuất IL-10.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các tế bào Tr1 có vai trò quan trọng trong sự dung nạp ngoại vi. Các tế bào Tr1 là đặc biệt quan trọng trong việc hạn chế sự hư hại mô đối với vật chủ trong quá trình đáp ứng miễn dịch viêm. Sự tạo thành tế bào Tr1 đi kèm với cả đáp ứng miễn dịch TH1 và TH2 *in vivo* và *in vitro*.

Các tế bào Tr1 được tạo ra từ các tế bào T $CD4^+$ chưa qua thí nghiệm trong quá trình đáp ứng miễn dịch tế bào T được điều khiển bởi kháng nguyên. Các tế bào Tr1 không dị ứng để đáp lại việc truyền tín hiệu qua các thụ thể TCR, CD28 và IL-2 và có khả năng ức chế sự tăng sinh được điều khiển bởi kháng nguyên của tế bào T $CD4^+$ chưa qua thí nghiệm *in vivo* và *in vitro*. Các tế bào Tr1 có khả năng ức chế sự phát triển của các bệnh tự miễn và hạn chế đáp ứng miễn dịch đối với tác nhân gây bệnh vi khuẩn.

Trong khi tín hiệu phân tử mà dẫn đến các tế bào Tr1 được nghiên cứu, chỉ một số ít đã được biết về tín hiệu phân tử mà điều hoà âm sự tạo thành tế bào này. Mặc dù các thuốc ức chế miễn dịch, xytokine, phân tử đồng kích thích, và DC đã được bao hàm trong sự cảm ứng của các tế bào Tr1, tín hiệu mà điều hoà âm sự tạo thành tế bào Tr1 vẫn chưa được biết đến.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sự hoạt hóa của thụ thể OX40 phong bế sự tạo thành Tr1 từ tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm hoặc ghi nhớ cũng như sự sản xuất IL-10 từ các tế bào Tr1 và chức năng kìm hãm miễn dịch của các tế bào Tr1. Sự hoạt hóa của thụ thể OX40 còn phong bế sự sản xuất IL-10 bởi các tế bào Foxp3⁺ T-reg và chức năng kìm hãm miễn dịch. Như vậy, sáng chế đề cập đến các kháng thể chủ vận mà liên kết với thụ thể OX40, trong đó chất chủ vận điều biến sự hoạt hóa của thụ thể OX40 để phong bế sự tiết cytokin IL-10 và/hoặc các tế bào Tr1 và Foxp3⁺ T-reg toàn bộ chức năng kìm hãm miễn dịch. Về cơ bản, các kháng thể có thể bắt chước phối tử OX40 và hoạt hóa thụ thể OX40 trên Tr1 và/hoặc trên các tế bào điều hoà T tự nhiên (“nTregs”), còn được gọi là “Foxp3⁺ T-regs.”

Như các tác giả sáng chế đã chỉ ra trong các đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 11/659,266 và 12/861,135, OX40L ức chế sự tạo thành và chức năng của các tế bào Tr1 sản xuất IL-10 từ tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm và ghi nhớ mà được kích thích bởi các chất ức chế miễn dịch dexamethason và vitamin D3. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng OX40L ức chế sự tạo thành và chức năng của tế bào T điều hoà sản xuất IL-10. Phát hiện này chứng tỏ rằng việc truyền tín hiệu OX40 bởi OX40L ức chế sự tạo thành của tế bào T ức chế miễn dịch sản xuất IL-10 ở người trong môi trường nuôi cấy. Chức năng duy nhất của OX40L không có ở hai thành phần họ TNF đồng kích thích khác, phối tử GITR và phối tử 4-1BB. OX40L cũng ức chế mạnh sự tạo thành và chức năng của các tế bào Tr1 sản xuất IL-10 được kích thích bởi hai kích thích sinh lý được cung cấp bởi phối tử đồng kích thích chịu cảm ứng và DC chưa trưởng thành. Việc truyền tín hiệu thụ thể OX40 trên tế bào T ở người bởi kháng thể đơn dòng, phân tử nhỏ, hoặc bởi OX40L, hoặc protein có độ tương đồng ít nhất là 90% với nó, điều biến và điều hòa sự tạo thành và chức năng của tế bào T ức chế miễn dịch sản xuất IL-10.

Phát hiện này dẫn đến một số ứng dụng trong điều trị. Ví dụ, các kháng thể chủ vận, phân tử nhỏ, hoặc OX40L có thể được sử dụng để ức chế sự tạo thành và chức năng của tế bào T ức chế miễn dịch sản xuất IL-10 và do vậy có thể được sử dụng để tăng cường đáp ứng miễn dịch để điều trị ung thư và các bệnh lây nhiễm, hoặc làm chất phụ trợ cho các vacxin trị ung thư. Các kháng thể đối kháng đối với OX40 hoặc đối với OX40L, hoặc phân tử nhỏ đối kháng, có thể được sử dụng để

tăng cường sự tạo thành và chức năng của tế bào T ức chế miễn dịch sản xuất IL-10 và do vậy có thể được sử dụng để phát triển các phương pháp điều trị đối với các bệnh tự miễn và bệnh vật chủ chống lại mảnh ghép. Phát hiện của các tác giả sáng chế còn đề xuất phương pháp năng suất cao để sàng lọc các kháng thể hoặc phân tử nhỏ hoặc hoạt hoá thụ thể OX40 (hoặc phong bế ngược việc truyền tín hiệu OX40) trên tế bào T để phát triển trị liệu ung thư, hoặc theo cách khác, các bệnh tự miễn, và bệnh vật chủ chống lại mảnh ghép.

Sáng chế đề xuất các kháng thể ở người và đơn dòng (đôi khi trong bản mô tả này gọi là “kháng thể kháng OX40” và/hoặc dạng cải biến khác của chúng) mà liên kết thụ thể OX40 ở người. Các kháng thể này có thể có tác dụng trong việc điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh hoặc tình trạng bệnh cấp hoặc mạn tính mà bệnh học của nó bao gồm OX40. Theo một khía cạnh, kháng thể người được phân lập, hoặc phân liên kết kháng nguyên của chúng, mà liên kết với OX40 ở người và hữu hiệu để điều trị ung thư hoặc điều trị bệnh tự miễn được mô tả. Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng OX40 được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng làm thuốc. Một hoặc nhiều kháng thể kháng OX40 bất kỳ có thể được sử dụng để điều trị một hoặc nhiều bệnh ung thư hoặc bệnh tự miễn khác nhau được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế đề xuất các kháng thể được làm giống người được phân lập mà liên kết với OX40. Các kháng thể được phân lập như được mô tả trong bản mô tả này liên kết với OX40, và có thể liên kết với OX40 được mã hoá bằng các gen sau: NCBI Số nộp lưu NP_003317, Genpept Số nộp lưu P23510, hoặc gen có độ tương đồng là 90% với chúng. Kháng thể được phân lập được đề xuất trong bản mô tả này có thể liên kết thêm với thụ thể OX40 có một trong số các Số nộp lưu GenBank sau: AAB39944, CAE11757, hoặc AAI05071.

Như nêu trong bản mô tả này, kháng thể được phân lập được lấy làm ví dụ mà liên kết với OX40 gồm: (a) vùng thay đổi chuỗi nặng CDR1 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1; (b) vùng thay đổi chuỗi nặng CDR2 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2; (c) vùng thay đổi chuỗi nặng CDR3 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3; (d) vùng thay đổi chuỗi nhẹ CDR1 gồm trình tự axit amin

của SEQ ID NO: 7; (e) vùng thay đổi chuỗi nhẹ CDR2 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8; và (f) vùng thay đổi chuỗi nhẹ CDR3 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9.

Ngoài ra, ví dụ khác là kháng thể được phân lập mà liên kết với OX40 gồm: (a) vùng thay đổi chuỗi nặng CDR1 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13; (b) vùng thay đổi chuỗi nặng CDR2 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14; (c) vùng thay đổi chuỗi nặng CDR3 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15; (d) vùng thay đổi chuỗi nhẹ CDR1 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19; (e) vùng thay đổi chuỗi nhẹ CDR2 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20; và (f) vùng thay đổi chuỗi nhẹ CDR3 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21.

Theo cách khác, kháng thể được phân lập có thể có vùng thay đổi chuỗi nặng CDR1 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 13; vùng thay đổi chuỗi nặng CDR2 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 hoặc 14; và/hoặc vùng thay đổi chuỗi nặng CDR3 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 hoặc 15, hoặc vùng thay đổi chuỗi nặng CDR có độ tương đồng là 90% so với chúng.

Ngoài ra, kháng thể được phân lập có thể có vùng thay đổi chuỗi nhẹ CDR1 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 hoặc 19; vùng thay đổi chuỗi nhẹ CDR2 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 hoặc 20 và/hoặc vùng thay đổi chuỗi nhẹ CDR3 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 hoặc 21, hoặc vùng thay đổi chuỗi nặng có độ tương đồng là 90% so với chúng.

Kháng thể phân lập được có thể có vùng thay đổi chuỗi nhẹ (“VL”) gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, 11, 22 hoặc 23, hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 90% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, 11, 22 hoặc 23. Kháng thể được phân lập có thể có vùng thay đổi chuỗi nặng (“VH”) gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4, 5, 16 và 17, hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 90% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4, 5, 16 và 17. Như vậy, ví dụ như, kháng thể được phân lập có thể gồm trình tự chuỗi nặng thay đổi SEQ ID NO: 5 và trình tự chuỗi nhẹ thay đổi SEQ ID NO: 11, hoặc trình tự có độ tương đồng là 90% so với chúng. Tương tự, kháng thể được phân lập có thể có trình

tự chuỗi nặng thay đổi là SEQ ID NO: 17 và trình tự chuỗi nhẹ thay đổi là SEQ ID NO: 23 hoặc trình tự có độ tương đồng là 90% so với chúng.

Kháng thể phân lập được có thể có chuỗi nhẹ thay đổi được mã hoá bởi trình tự axit nucleic SEQ ID NO: 12, hoặc 24, hoặc trình tự axit nucleic có độ tương đồng ít nhất là 90% so với trình tự nucleotit SEQ ID NO: 12 hoặc 24. Kháng thể được phân lập có thể có chuỗi nặng thay đổi được mã hoá bởi trình tự axit nucleic SEQ ID NO: 6 hoặc 18, hoặc trình tự axit nucleic có độ tương đồng ít nhất là 90% so với trình tự nucleotit SEQ ID NO: 6 hoặc 18.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể đơn dòng. Kháng thể đơn dòng có thể có chuỗi nhẹ thay đổi gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10 hoặc 22, hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 90% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10 hoặc 22. Sáng chế cũng đề xuất kháng thể đơn dòng có chuỗi nặng thay đổi gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4 hoặc 16, hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 90% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4 hoặc 16.

Sáng chế còn đề xuất axit nucleic được phân lập mã hóa cho kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng OX40 được nêu trong bản mô tả này. Sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ, mỗi tế bào chủ chứa axit nucleic mã hóa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng OX40 được mô tả trong bản mô tả này. Các phương pháp sản xuất kháng thể (như tế bào chủ chứa axit nucleic mã hóa cho kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng OX40 được mô tả trong bản mô tả này) bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ sao cho kháng thể được sản xuất, và/hoặc thu lấy kháng thể từ tế bào chủ, cũng được đề xuất.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Phương thức trong đó các dấu hiệu, khía cạnh và ưu điểm của sáng chế được nêu trên đây, cũng như các phương thức khác sẽ trở nên rõ ràng, đạt được và có thể hiểu được chi tiết, cụ thể hơn trong phần bản chất kỹ thuật theo sáng chế được tóm tắt trên đây có thể tham khảo tới các phương án của chúng mà được minh họa trong các hình vẽ là một phần của bản mô tả này. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng, các hình vẽ kèm theo minh họa cho một số phương án theo sáng chế và do vậy, không được

hiệu mà làm giới hạn phạm vi của sáng chế, sáng chế có thể có các phương án hữu hiệu tương tự khác.

Fig. 1 thể hiện rằng Foxp3⁺ Tregs xâm nhập vào mô u lympho nang ở người (FL) và định vị đồng thời với tế bào B và bạch cầu đơn nhân khối u. Bên trái: nhuộm màu miễn dịch kép Foxp3⁺ Tregs (màu đỏ) và tế bào u lympho B CD20⁺ (xanh lá cây); Bên phải: Foxp3⁺ Tregs (màu đỏ) và bạch cầu đơn nhân/đại thực bào/DC CD11c⁺ (xanh lá cây).

Các Fig. 2A và Fig. 2B thể hiện số lượng tăng lên của CD4⁺Foxp3⁺ Tregs ở bệnh nhân mắc FL. Các tế bào khối u và PBMC thu được từ sáu bệnh nhân mắc FL theo chẩn đoán ban đầu trước khi trị liệu. PBMC cũng thu được từ sáu thể cho bình thường để so sánh. Tỷ lệ phần trăm của tế bào T điều hoà trên tổng số tế bào T CD4⁺ được xác định bằng phân tích bào kế chảy của CD4⁺CD25⁺CD127^{thấp}Foxp3⁺ Tregs. Fig. 2A thể hiện phân tích FACS đại diện của Tregs. Các tế bào khối u FL PBMC và FL được chia ra từ cùng người bệnh. Fig. 2B thể hiện tỷ lệ phần trăm của Tregs của tất cả thể cho. Thanh ngang chỉ giá trị trung bình.

Fig. 3 thể hiện sự tách của ICOS⁺Foxp3⁺ hoặc ICOS⁻Foxp3⁺ Tregs từ FL. Huyền phù tế bào đơn lẻ thu được từ mẫu lá lách trước khi thực hiện việc điều trị bất kỳ. Các tế bào được làm tan vào ngày thử nghiệm. Tế bào T CD4⁺CD8⁻CD14⁻CD16⁻CD56⁻CD11c⁻TCRγδ⁻ được làm giàu được chia ra thành các nhóm phụ CD25^{thấp} và CD25^{cao}. CD4⁺CD25^{cao}Foxp3⁺ Tregs được phân loại tiếp thành các nhóm phụ ICOS^{cao} và ICOS^{thấp} dựa trên sự biểu hiện bề mặt của ICOS. Sự biểu hiện nội bào của FOXP3 được xác định trong tất cả các nhóm phụ.

Fig. 4 thể hiện Tregs trong khối u ức chế sự tăng sinh của tế bào T CD4⁺CD25⁻ thâm nhập trong FL, và sự ức chế có thể bị phong bế một phần bởi các kháng thể trung hoà kháng IL-10. Tế bào T thâm nhập khối u CD4⁺CD25⁻ được gắn nhãn CFSE được nuôi cấy với các tế bào khối u tự sinh được hoạt hoá trước bằng CD40L tái tổ hợp trong sự có mặt hoặc vắng mặt của Tregs ICOS⁺Foxp3⁺ tự sinh hoặc Tregs ICOS⁻Foxp3⁺, hoặc kháng IL-10 (10 µg/ml). Sau 72 giờ nuôi cấy, sự tăng sinh của các tế bào CD4⁺CD25⁻ được xác định bằng phân tích bào kế chảy của dịch pha loãng CFSE.

Fig. 5A thể hiện phân tích nội bào của xytokin được sản xuất bằng tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm như được xác định bằng bào kế chảy theo phương án của phương pháp theo sáng chế.

Fig. 5B thể hiện xytokin được sản xuất bằng tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm như được xác định bằng ELISA theo phương án của phương pháp theo sáng chế.

Fig. 5C thể hiện chức năng kìm hãm bởi các tế bào Tr1 sản xuất IL-10 như được xác định bằng sự kết hợp [³H]thymidin theo phương án của phương pháp theo sáng chế.

Fig. 6A thể hiện phân tích nội bào của xytokin được sản xuất bằng tế bào T CD4⁺ ghi nhớ như được xác định bằng bào kế chảy theo phương án của phương pháp theo sáng chế.

Fig. 6B thể hiện sự sản xuất IL-10 bằng tế bào T CD4⁺ ghi nhớ như được xác định bằng ELISA theo phương án của phương pháp theo sáng chế.

Fig. 7A thể hiện phân tích nội bào của xytokin được sản xuất bằng tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm như được xác định bằng bào kế chảy theo phương án của phương pháp theo sáng chế.

Fig. 7B thể hiện sự sản xuất IL-10 bằng tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm như được xác định bằng ELISA theo phương án của phương pháp theo sáng chế.

Fig. 7C thể hiện số lượng của tế bào T sống được đếm theo phương án của phương pháp theo sáng chế.

Fig. 8A thể hiện phân tích nội bào của xytokin được sản xuất bằng tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm như được xác định bằng bào kế chảy theo phương án của phương pháp theo sáng chế.

Fig. 8B thể hiện sự sản xuất IL-10 bằng tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm như được xác định bằng ELISA theo phương án của phương pháp theo sáng chế.

Fig. 8C thể hiện phân tích nội bào của xytokin được sản xuất bằng tế bào T CD4⁺ ghi nhớ như được xác định bằng bào kế chảy theo phương án của phương pháp theo sáng chế.

Fig. 8D thể hiện sự sản xuất IL-10 bằng tế bào T CD4⁺ ghi nhớ như được xác định bằng ELISA theo phương án của phương pháp theo sáng chế.

Fig. 8E thể hiện phân tích nội bào của xytokin được sản xuất bằng tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm như được xác định bằng bào kế chảy theo phương án của phương pháp theo sáng chế.

Fig. 8F thể hiện sự sản xuất IL-10 bằng tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm như được xác định bằng ELISA theo phương án của phương pháp theo sáng chế.

Fig. 9 thể hiện sự sản xuất IL-10 bằng tế bào T điều hoà như được xác định bằng ELISA theo phương án của phương pháp theo sáng chế.

Fig. 10 thể hiện kết quả của việc sàng lọc phần dịch nổi thể lai tế bào ở người kháng OX40 chống lại L-OX40 so với các tế bào bố mẹ L như được xác định bằng ELISA.

Fig. 11 thể hiện việc sàng lọc kháng thể đơn dòng đặc hiệu OX40 ở người như được xác định bằng phân tích bào kế chảy theo phương án của phương pháp theo sáng chế.

Fig. 12 thể hiện sự xác nhận của tính đặc hiệu kháng thể đơn dòng kháng hOX40 bằng cách sử dụng các tế bào SUPM2 biểu hiện OX40 (SUPM2-OX40) theo phương án của phương pháp theo sáng chế.

Fig. 13 thể hiện kháng thể đơn dòng đặc hiệu OX40 mà có thể ức chế sự tạo thành tế bào sản xuất IL-10 (Tr1) từ tế bào T CD4⁺ được kích thích bởi vit D₃ (0,1 µM)/Dex (50 nm), CD32L/ICOSL và kháng CD3/CD28 (0,2 µg/ml) theo phương án của phương pháp theo sáng chế. Dữ liệu phân loại tế bào được hoạt hoá phát huỳnh quang đại diện (Flourescence Activated Cell Sorting - FACS) được thể hiện ở A và tỷ lệ phần trăm của các tế bào sản xuất IL-10 đối với tất cả việc điều trị kháng thể đơn dòng OX40 được thể hiện ở B.

Fig. 14 thể hiện kết quả của kháng thể đơn dòng đặc hiệu hOX40 mà ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 cũng kích thích sự tăng sinh tế bào T CD4⁺ theo phương án của phương pháp theo sáng chế.

Các Fig. 15A và Fig. 15B thể hiện sự chuẩn độ của kháng thể đơn dòng OX40 đối với khả năng của chúng để ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 từ tế bào T CD4⁺ theo phương án của phương pháp theo sáng chế. Dữ liệu FACS đại diện được thể hiện trên Fig. 15A và tỷ lệ phần trăm của các tế bào Tr1 sau khi xử lý bằng chín kháng thể đơn dòng OX40 được thể hiện trên Fig. 15B.

Các Fig. 16A, Fig. 16B, và Fig. 16C thể hiện kháng thể đơn dòng đặc hiệu OX40 mà ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 sản xuất IL-10 từ tế bào T CD4⁺ cũng ức chế sự sản xuất IL-10 ICOS⁺CD4⁺CD25^{cao}CD127⁻ Treg và chức năng kìm hãm miễn dịch. ICOS⁺CD4⁺CD25^{cao}CD127⁻ Tregs (ICOS⁺Tregs) mới được lựa chọn được kích thích bằng kháng CD3 (0,2 µg/ml) trong điều kiện có mặt các tế bào CD32L/ICOSL và các tế bào CD32L/OX40L (Fig. 16A) hoặc kháng thể đơn dòng OX40 hoặc kháng thể đối chứng (Fig. 16B) trong năm ngày. Các tế bào sau đó được kích thích lại bằng kháng CD3/CD28 trong 24 giờ và phần dịch nổi được thử nghiệm đối với IL-10 bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzyme (ELISA). Fig. 16C là thử nghiệm tăng sinh dựa trên bạch cầu đơn nhân thể hiện rằng hai kháng thể phong bế chức năng ICOS⁺Treg.

Các Fig. 17A và Fig. 17B thể hiện việc nhận dạng kháng thể đơn dòng kháng hOX40 mà ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 và phong bế chức năng Foxp3⁺CD4⁺CD25^{cao} Treg theo phương án của phương pháp theo sáng chế. Phân tích bào kế chảy đại diện được thể hiện trên Fig. 17A. Dữ liệu đối với sáu kháng thể đơn dòng được thể hiện trên Fig. 17B.

Fig. 18 chứng tỏ việc nhận dạng kháng thể đơn dòng kháng hOX40 mà không ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 nhưng phong bế chức năng Foxp3⁺CD4⁺CD25^{cao} Treg theo phương án của phương pháp theo sáng chế.

Các Fig. 19A và Fig. 19B thể hiện các kháng thể chủ vận kháng hOX40 phong bế chức năng CD4⁺CD25^{cao} Treg có nguồn gốc từ u lympho theo phương án

của phương pháp theo sáng chế. Phân tích FACS đại diện được thể hiện trên Fig. 19A và dữ liệu đối với tất cả các thử nghiệm được thể hiện trên Fig. 19B.

Fig. 20 thể hiện rằng kháng thể đơn dòng kháng hOX40 có thể liên kết với tế bào T CD4⁺ của khí rezut. Như được thể hiện, sáu mAbs kháng hOX40 có thể liên kết với tế bào T CD4⁺ được hoạt hóa của khí rezut và sẽ liên kết với OX40 của khí rezut để hoạt hóa việc truyền tín hiệu OX40.

Fig. 21 thể hiện rằng mỗi trong số các kháng thể Hu106-222 lô I và II của Ví dụ I chứa chuỗi nặng có khối lượng phân tử khoảng 50 kD và chuỗi nhẹ có khối lượng phân tử khoảng 25 kD. Độ tinh khiết của các kháng thể Hu106-222 lô I và II được thể hiện là lớn hơn 95%.

Fig. 22 thể hiện phân tích của các kháng thể 106-122, Ch106 và Hu106-222 ở chuột (Lô II) để liên kết với các tế bào L/OX40 (Ví dụ I).

Fig. 23 biểu thị cấu trúc dạng sơ đồ của vector biểu hiện đối với kháng thể Hu106 IgG1/kappa (Vector biểu hiện). Tiến trình theo chiều kim đồng hồ từ vị trí SalI ở phần trên, plasmit chứa đơn vị phiên mã chuỗi nặng bắt đầu với gen khởi đầu sớm ngay cạnh chính cytomegalovirut ở người (CMV) và gen tăng cường (gen khởi đầu CMV) để khởi đầu sự phiên mã của gen chuỗi nặng kháng thể. Sau đó, gen khởi đầu CMV là exon VH, trình tự hệ gen chứa vùng không đổi chuỗi nặng gamma-1 ở người gồm CH1, vùng bản lề, các exon CH2 và CH3 với các intron xen kẽ, và vị trí polyadenyl hóa sau exon CH3. Sau trình tự gen chuỗi nặng, đơn vị phiên mã chuỗi nhẹ bắt đầu với gen khởi đầu CMV, sau đó là exon VL và trình tự hệ gen chứa exon vùng không đổi chuỗi kappa ở người (CL) với một phần của intron ở trước nó, và vị trí polyadenyl hóa sau exon CL. Ở sau gen chuỗi nhẹ là gen khởi đầu sớm SV40 (gen khởi đầu SV40), gen xanthin guanin phosphoribosyl transferaza E. coli (gpt), và phân đoạn chứa vị trí polyadenyl hóa SV40 (vị trí SV40 poly(A)). Cuối cùng, plasmit chứa một phần của plasmit pUC19, gồm điểm mở đầu sao chép vi khuẩn của sự sao chép (ori pUC) và gen beta-lactamaza (beta lactamaza). Các vị trí của các vị trí enzyme giới hạn liên quan được thể hiện trong hình vẽ.

Fig. 24 thể hiện sự so sánh giữa các kháng thể Hu 106-222 lô I và II để liên kết với các tế bào L/OX40 (Ví dụ I dưới đây).

Fig. 25 thể hiện Hu119-122 chứa chuỗi nặng có khối lượng phân tử khoảng 50 kD và chuỗi nhẹ có khối lượng phân tử khoảng 25 kD. Độ tinh khiết của Hu119 được thể hiện là lớn hơn 95% (Ví dụ II dưới đây).

Fig. 26 thể hiện kết quả của phân tích FACS của các kháng thể Ch119-122 và Hu119-122 được mô tả trong bản mô tả này (Ví dụ II dưới đây).

Fig. 27 thể hiện rằng dòng mAb kháng OX40 của người được làm giống người 119-122 (Hu119), và kháng thể đột biến liên kết FcR của nó (Hu119-AA) tăng cường sự tăng sinh tế bào T $CD4^+$ chưa qua thí nghiệm. Hu119-122 thu được hoạt tính kích thích tế bào T tốt hơn so với mAb kháng OX40 của người ở chuột nhắt bố mẹ (119-122 chuột nhắt). Tuy nhiên, mAb kháng OX40 của người khảm (Ch119, VH và VL ở chuột nhắt mà là vùng không đổi gamma-1 và kappa ở người) thất bại trong việc tăng cường sự tăng sinh tế bào T.

Fig. 28 thể hiện mAb kháng OX40 của người được làm giống người đột biến liên kết FcR dòng 106-222 (Hu222AA) và mAb kháng OX40 của người khảm dòng 106-222 (Ch222) tăng cường sự tăng sinh tế bào T $CD4^+$ chưa qua thí nghiệm được kích thích kháng CD3. Các kháng thể này có hoạt tính kích thích tương tự so với mAb kháng OX40 của người ở chuột nhắt bố mẹ (222 chuột nhắt). Tuy nhiên, Ab kháng OX40 của người được làm giống người hoàn toàn, Hu222, không tăng cường sự tăng sinh tế bào T so với IgG1 ở người.

Fig. 29A và Fig. 29B thể hiện rằng mAb kháng OX40 của người ở chuột nhắt và được làm giống người dòng 119-122 phong bế chức năng kìm hãm Treg $CD4^+$.

Fig. 30 thể hiện dữ liệu thể hiện các kháng thể kháng OX40 của người tăng cường sự tăng sinh tế bào T $CD4^+$ và $CD8^+$ bằng cách sử dụng các kháng thể liên kết đĩa.

Fig. 31 thể hiện các kháng thể kháng OX40 của người ở chuột nhắt và được làm giống người đòi hỏi sự liên kết ngang để tăng cường sự tăng sinh tế bào T.

Fig. 32 thể hiện các kháng thể kháng OX40 của người phong bế hoạt tính của $CD4^+Foxp3^+nTregs$ bằng cách sử dụng các kháng thể liên kết đĩa.

Fig. 33 thể hiện rằng hàm lượng cao của các kháng thể kháng OX40 của người ở chuột nhắt tốt hơn là giết chết $Foxp3^+$ Tregs.

Fig. 34 thể hiện mAb kháng OX40 của người ở chuột nhắt tác động trực tiếp lên tế bào T hiệu ứng hoặc nTregs để phong bế chức năng kìm hãm của Tregs.

Các Fig. 35A, Fig. 35B, và Fig. 35C thể hiện kết quả của việc điều trị khối u mAb kháng hOX40 ở chuột nhắt được truyền phù hợp bằng tế bào T hOX40⁺CD8⁺. mAb kháng OX40 của người thúc đẩy sự phát triển và tỷ lệ sống sót tế bào T *in vivo*. Việc điều trị sử dụng chế độ vaccin được thể hiện trên Fig. 35A. Các ảnh phát quang sinh học *in vivo* đại diện được thể hiện trên Fig. 35B. Kết quả của việc điều trị khối u bằng kháng thể được thể hiện trên Fig. 35C.

Fig. 36 thể hiện sự sắp thẳng hàng của các trình tự axit amin của 106-222, 106-222 được làm giống người (Hu106), và các trình tự VH X61012 chất nhận ở người (Số nộp lưu ngân hàng gen) được thể hiện. Các gốc axit amin được thể hiện bằng mã một chữ cái. Các con số ở trên các trình tự chỉ ra các vị trí theo Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Cùng trình tự như được yêu cầu bảo hộ trong bản mô tả này cũng được nêu trong danh mục trình tự và số lượng vị trí có thể là khác nhau. Trên Fig. 36, các trình tự CDR đã được xác định bởi Kabat et al. (1991) được gạch chân trong 106-222 VH. Các gốc CDR trong X61012 VH được bỏ qua trong hình vẽ. Trình tự VH ở người tương đồng với khung hoạt động 106-222 VH được nghiên cứu trong cơ sở dữ liệu ngân hàng gen, và trình tự VH được mã hoá bởi cADN X61012 ở người (X61012 VH) được chọn làm chất nhận để làm giống người. Các trình tự CDR của 106-222 VH trước hết được chuyển tới vị trí tương ứng của X61012 VH. Tiếp theo, ở các vị trí khung hoạt động trong đó mẫu ba chiều của các vùng thay đổi 106-222 gợi ý sự tiếp xúc đáng

kể với CDR, các gốc axit amin của VH 106-222 ở chuột nhất được thể cho các gốc ở người tương ứng. Các sự thể này được thực hiện ở các vị trí 46 và 94 (được gạch chân trong VH Hu106). Ngoài ra, gốc khung hoạt động ở người mà được phát hiện là không điển hình trong nhóm phụ vùng V tương ứng được thể bằng gốc thông thường nhất để làm giảm khả năng miễn dịch tiềm năng. Việc thể này được thực hiện ở vị trí 105 (được gạch chân hai lần trong VH Hu106).

Fig. 37 thể hiện sự sắp thẳng hàng của các trình tự axit amin của 106-222, 106-222 được làm giống người (Hu106), và trình tự VL AJ388641 chất nhận ở người (Số nộp lưu ngân hàng gen) được thể hiện. Các gốc axit amin được thể hiện bằng mã một chữ cái. Các số lượng ở trên các trình tự chỉ các vị trí theo Kabat et al. (1991). Cùng trình tự như được yêu cầu bảo hộ trong bản mô tả này cũng được nêu trong danh mục trình tự mặc dù số lượng vị trí có thể là khác nhau. Các trình tự CDR đã được xác định bởi Kabat et al. (1) được gạch chân trong 106-222 VH. Các gốc CDR trong AJ388641 VL được bỏ qua trong hình vẽ. Trình tự VL ở người tương đồng với khung hoạt động VL 106-222 được nghiên cứu trong cơ sở dữ liệu ngân hàng gen, và trình tự VL được mã hoá bởi cADN AJ388641 ở người (AJ388641 VL) được chọn làm chất nhận để làm giống người. Các trình tự CDR của VL 106-222 được chuyển tới vị trí tương ứng của AJ388641 VL. Không có sự thể khung hoạt động được thực hiện ở dạng được làm giống người.

Fig. 38 thể hiện trình tự nucleotit của gen VH Hu106 được củng cố bên sườn bằng các vị trí SpeI và HindIII (được gạch chân) được thể hiện dọc theo trình tự axit amin được suy ra. Các gốc axit amin được thể hiện bằng mã một chữ cái. Trình tự peptit tín hiệu được in nghiêng. Gốc axit amin đầu tận N (Q) của VH trưởng thành được gạch chân hai lần. Các trình tự CDR theo định nghĩa của Kabat et al. (1991) được gạch chân. Cùng trình tự như được yêu cầu bảo hộ trong bản mô tả này cũng được đề xuất theo danh mục trình tự và số lượng vị trí có thể là khác nhau theo danh mục trình tự. Trình tự intron được in nghiêng. Mảnh gen VH Hu106 được phân cắt bằng SpeI và HindIII được tách dòng giữa các vị trí tương ứng trong vector biểu hiện được thể hiện trên Fig. 23.

Fig. 39 thể hiện trình tự nucleotit của gen VL Hu106-222 được củng cố bên sườn bởi các vị trí NheI và EcoRI (được gạch chân) được thể hiện dọc theo trình tự axit amin được suy ra. Các gốc axit amin được thể hiện bằng mã một chữ cái. Trình tự peptit tín hiệu được in nghiêng. Gốc axit amin đầu tận N (D) của VL trưởng thành được gạch chân hai lần. Các trình tự CDR theo định nghĩa của Kabat et al. (1991) được gạch chân. Trình tự intron được in nghiêng. Mảnh gen VL Hu106 được phân cắt bằng NheI và EcoRI được tách dòng giữa các vị trí tương ứng trong vector biểu hiện được thể hiện trên Fig. 23. Cùng trình tự như được yêu cầu bảo hộ trong bản mô tả này cũng được đề xuất theo danh mục trình tự mặc dù số lượng vị trí có thể là khác nhau theo danh mục trình tự.

Fig. 40 thể hiện sự sắp thẳng hàng của các trình tự axit amin của 119-122, 119-122 được làm giống người (Hu119), và các trình tự VH Z14189 chất nhận ở người (Số nộp lưu ngân hàng gen) được thể hiện. Các gốc axit amin được thể hiện bằng mã một chữ cái. Các số ở trên các trình tự chỉ các vị trí theo Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Các trình tự CDR đã được xác định bởi Kabat et al. (1991) được gạch chân trong VH 119-122. Các gốc CDR trong VH Z14189 được bỏ qua trong hình vẽ. Trình tự VH ở người tương đồng với khung hoạt động VH 119-122 được nghiên cứu trong cơ sở dữ liệu ngân hàng gen, và trình tự VH được mã hoá bởi cADN Z14189 ở người (Z14189 VH) được chọn làm chất nhận để làm giống người. Các trình tự CDR của VH 119-122 trước hết được chuyển tới vị trí tương ứng của VH Z14189. Tiếp theo, ở các vị trí khung hoạt động trong đó mẫu ba chiều của vùng thay đổi 119-122 gợi ý sự tiếp xúc đáng kể với CDR, các gốc axit amin của VH 119-122 ở chuột nhất được thể cho các gốc ở người tương ứng. Các sự thể này được thực hiện ở các vị trí 26, 27, 28, từ 30 đến 47 (được gạch chân trong trình tự VH Hu119) như được thể hiện trên hình vẽ. Cùng trình tự như được yêu cầu bảo hộ trong bản mô tả này cũng được đề xuất theo danh mục trình tự mặc dù số lượng vị trí có thể là khác nhau theo danh mục trình tự.

Fig. 41 thể hiện sự sắp thẳng hàng của các trình tự axit amin của 119-122, 119-122 được làm giống người (Hu119), và trình tự VL M29469 chất nhận ở người

(Số nộp lưu ngân hàng gen) được thể hiện. Các gốc axit amin được thể hiện bằng mã một chữ cái. Các số ở trên các trình tự chỉ các vị trí theo Kabat et al. (1991). Các trình tự CDR đã được xác định bởi Kabat et al. (1) được gạch chân trong VL 119-122. Các gốc CDR trong VL M29469 được bỏ qua theo trình tự. Trình tự VL ở người tương đồng với khung hoạt động VL 119-122 được nghiên cứu trong cơ sở dữ liệu ngân hàng gen, và trình tự VL được mã hoá bởi cADN M29469 ở người (VL M29469) được chọn làm chất nhận để làm giống người. Các trình tự CDR của VL 119-122 được chuyển tới vị trí tương ứng của VL M29469. Không có sự thể khung hoạt động cần thiết ở dạng được làm giống người. Cùng trình tự như được yêu cầu bảo hộ trong bản mô tả này cũng được đề xuất theo danh mục trình tự mặc dù số lượng vị trí có thể là khác nhau theo danh mục trình tự.

Fig. 42 thể hiện trình tự nucleotit gen VH Hu119 được củng cố bên sườn bởi các vị trí SpeI và HindIII (được gạch chân) được thể hiện dọc theo với trình tự axit amin được suy ra. Các gốc axit amin được thể hiện bằng mã một chữ cái. Trình tự peptit tín hiệu được in nghiêng. Gốc axit amin đầu tận N (E) của VH trưởng thành được gạch chân hai lần. Các trình tự CDR theo định nghĩa của Kabat et al. (1991) được gạch chân. Trình tự intron được in nghiêng. Mảnh gen VH Hu119 được phân cắt bằng SpeI và HindIII được tách dòng giữa các vị trí tương ứng trong vector biểu hiện được thể hiện trên Fig. 23. Cùng trình tự như được yêu cầu bảo hộ trong bản mô tả này cũng được đề xuất theo danh mục trình tự mặc dù số lượng vị trí có thể là khác nhau theo danh mục trình tự.

Fig. 43 thể hiện trình tự nucleotit của gen VL Hu119 được củng cố bên sườn bởi các vị trí NheI và EcoRI (được gạch chân) được thể hiện dọc theo với trình tự axit amin được suy ra. Các gốc axit amin được thể hiện bằng mã một chữ cái. Trình tự peptit tín hiệu được in nghiêng. Gốc axit amin đầu tận N (E) của VL trưởng thành được gạch chân hai lần. Các trình tự CDR theo định nghĩa của Kabat et al. (1991) được gạch chân. trình tự intron được in nghiêng. Mảnh gen VL Hu119 được phân cắt bằng NheI và EcoRI được tách dòng giữa các vị trí tương ứng trong vector biểu hiện được thể hiện trên Fig. 23. Cùng trình tự như được yêu cầu bảo hộ trong bản mô tả này cũng được đề xuất theo danh mục trình tự mặc dù số lượng vị trí có thể là khác nhau theo danh mục trình tự.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ "kháng thể" gồm phân tử globulin miễn dịch chứa bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được nối nội phân tử bằng liên kết disulfua. Mỗi chuỗi nặng chứa vùng thay đổi chuỗi nặng (trong bản mô tả này được viết tắt là HCVR hoặc VH) và vùng không đổi chuỗi nặng. Vùng không đổi chuỗi nặng bao gồm ba miền, CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ chứa vùng thay đổi chuỗi nhẹ (trong bản mô tả này được viết tắt là LCVR hoặc VL) và vùng không đổi chuỗi nhẹ. Vùng không đổi chuỗi nhẹ chứa một miền, CL. Các vùng VH và VL có thể còn được chia nhỏ thành các vùng siêu biến, được gọi là các vùng quyết định bổ thể (CDR), được đặt rải rác với các vùng mà được bảo toàn hơn, được gọi là các vùng khung hoạt động (FR). Mỗi VH và VL bao gồm ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu tận amino đến đầu tận carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể (hoặc "phần kháng thể") gồm mảnh của kháng thể mà giữ lại khả năng để liên kết đặc hiệu với kháng nguyên (ví dụ, hOX40). Đã chứng minh được rằng chức năng liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể được thực hiện bởi mảnh của kháng thể nguyên chiều dài. Ví dụ về mảnh liên kết được bao hàm trong thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể gồm (i) mảnh Fab, mảnh hoá trị một gồm các miền VL, VH, CL và CH1; (ii) mảnh F(ab')₂, mảnh hóa trị hai gồm hai mảnh Fab được liên kết bởi cầu disulfua ở vùng bản lề; (iii) mảnh Fd gồm các miền VH và CH1; (iv) mảnh Fv gồm miền VL và VH của một nhánh của kháng thể, (v) mảnh dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), mà chứa miền VH; và (vi) vùng quyết định bổ thể được phân lập (CDR). Ngoài ra, mặc dù hai miền của mảnh Fv, VL và VH, được mã hóa bởi các gen riêng rẽ, chúng có thể được kết hợp, bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp, bằng liên kết tổng hợp mà cho phép chúng được tạo thành chuỗi protein đơn lẻ trong đó các vùng VL và VH bắt cặp để tạo thành phân tử hoá trị một (được gọi là Fv chuỗi đơn (scFv); xem tài liệu ví dụ, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; và Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Các kháng thể chuỗi đơn này cũng được bao hàm trong thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể. Dạng khác của các kháng thể chuỗi đơn, như

diabody cũng được bao hàm. Diabody là các kháng thể đặc hiệu kép, hóa trị hai trong đó các miền VH và VL được biểu hiện trên chuỗi polypeptit đơn lẻ, nhưng sử dụng liên kết quá ngắn để cho phép bắt cặp giữa hai miền trên cùng chuỗi, nhờ đó ép buộc miền này bắt cặp với miền bổ sung của chuỗi khác và tạo ra hai vị trí liên kết kháng nguyên (xem tài liệu, ví dụ, Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123). Ngoài ra, kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng có thể là một phần của phân tử kết dính miễn dịch lớn hơn, được tạo thành bởi sự kết hợp cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị của kháng thể hoặc phần kháng thể với một hoặc nhiều protein hoặc peptit khác. Ví dụ về phân tử kết dính miễn dịch này bao gồm việc sử dụng vùng lõi streptavidin để tạo ra phân tử scFv tetrame (Kipriyanov, S. M., et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) và sử dụng gốc cysteine, peptit đánh dấu và đuôi polyhistidin đầu tận C để tạo ra phân tử scFv hóa trị hai và được biotinyl hóa (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Các phần kháng thể, như các mảnh Fab và $F(ab')_2$, có thể được điều chế từ các kháng thể nguyên vẹn bằng cách sử dụng kỹ thuật thông thường, như phân cắt bằng papain hoặc pepsin, lần lượt, đối với các kháng thể nguyên vẹn. Hơn nữa, các kháng thể, các phần kháng thể và phân tử kết dính miễn dịch có thể thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp tiêu chuẩn, như được mô tả trong bản mô tả này. Các phần liên kết kháng nguyên được ưu tiên là các miền hoàn chỉnh hoặc các cặp của các miền hoàn chỉnh.

OX40/phối tử OX40 (thụ thể OX40)/(OX40L) là cặp phân tử đồng kích thích thiết yếu đối với sự tăng sinh tế bào T, tỷ lệ sống sót, sự sản xuất cytokin, và sự tạo thành tế bào ghi nhớ. Thử nghiệm in vitro sớm chứng tỏ rằng việc truyền tín hiệu qua OX40 trên tế bào T $CD4^+$ dẫn đến TH2, nhưng không dẫn đến sự phát triển TH1. Các kết quả này được củng cố bởi các nghiên cứu in vivo thể hiện rằng việc phong bế tương tác OX40/OX40L làm ngăn ngừa sự cảm ứng và sự duy trì của đáp ứng miễn dịch dị ứng được điều tiết bởi TH2. Tuy nhiên, việc phong bế tương tác OX40/OX40L làm triệt tiêu hoặc ngăn ngừa bệnh được điều tiết bởi TH1. Ngoài ra, việc sử dụng OX40L hòa tan hoặc việc truyền gen của OX40L vào khối u được thể hiện là tăng cường mạnh khả năng gây miễn dịch kháng khối u ở chuột nhắt. Các

nguyên cứu gần đây còn cho thấy rằng OX40/OX40L có thể đóng vai trò trong việc kích thích đáp ứng miễn dịch được điều tiết bởi tế bào T CD8. Như được mô tả trong bản mô tả này, việc truyền tín hiệu OX40 phong bế chức năng kìm hãm của tế bào T điều hoà có trong tự nhiên CD4⁺CD25⁺ và cặp OX40/OX40L đóng vai trò quan trọng trong quá trình điều hòa chung của khả năng gây miễn dịch ngoại vi so với sự dung nạp.

Thuật ngữ "đánh số Kabat", "các định nghĩa Kabat" và "gắn nhãn Kabat" được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này. Các thuật ngữ này, mà được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này, dùng để chỉ hệ thống đánh số các gốc axit amin mà biến đổi hơn (tức là siêu biến) so với các gốc axit amin khác trong các vùng thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 và, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

Thuật ngữ "kháng thể người tái tổ hợp" gồm các kháng thể ở người mà được điều chế, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng phương pháp tái tổ hợp, như các kháng thể được biểu hiện bằng cách sử dụng vectơ biểu hiện tái tổ hợp được chuyển nhiễm vào tế bào chủ, các kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể người kết hợp, tái tổ hợp, các kháng thể được phân lập từ động vật (ví dụ, chuột nhắt) mà là gen chuyển đổi với gen immunoglobulin người (xem tài liệu, ví dụ, Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) hoặc các kháng thể được điều chế, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng phương pháp khác bất kỳ mà có liên quan đến việc phân mảnh trình tự gen immunoglobulin người thành trình tự ADN khác. Các kháng thể người tái tổ hợp này có vùng biến đổi và vùng không đổi thu được từ trình tự immunoglobulin dòng tế bào phôi người (xem tài liệu Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

"Kháng thể được phân lập" gồm kháng thể mà về cơ bản không chứa các kháng thể khác có các độ đặc hiệu kháng nguyên khác nhau (ví dụ, kháng thể được

phân lập mà liên kết đặc hiệu hOX40 về cơ bản không chứa của các kháng thể mà liên kết đặc hiệu kháng nguyên không phải là hOX40). Kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu hOX40 có thể liên kết phân tử OX40 từ khác loài. Hơn nữa, kháng thể được phân lập có thể là về cơ bản không chứa nguyên liệu tế bào và/hoặc hóa chất khác.

Thuật ngữ "hoạt tính" gồm các hoạt động như tính đặc hiệu/ái lực liên kết của kháng thể đối với kháng nguyên, ví dụ, kháng thể kháng OX40 của người mà liên kết với kháng nguyên OX40 và/hoặc khả năng hoạt hóa của kháng thể, ví dụ, kháng thể kháng OX40 mà liên kết của nó với thụ thể OX40 hoạt hóa hoạt tính sinh học của hOX40 hoặc sự hoạt hóa của liên kết thụ thể trong thử nghiệm tế bào L/OX40 người.

Thuật ngữ " K_{off} ", trong bản mô tả này, dùng để chỉ hằng số tốc độ phân ly của kháng thể từ phức hợp kháng thể/kháng nguyên. Thuật ngữ " K_d ", trong bản mô tả này, dùng để chỉ hằng số phân ly của sự tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể.

Thuật ngữ "cộng hưởng plasmon bề mặt" gồm hiện tượng quang học mà cho phép phân tích thời gian thực tương tác đặc hiệu sinh học bằng cách phát hiện những thay đổi trong hàm lượng protein trong ma trận cảm biến sinh học, ví dụ như bằng cách sử dụng hệ thống BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.). Để mô tả rõ hơn, xem Ví dụ 5 và tài liệu Jonsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; và Johnson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277.

Thuật ngữ "vector" gồm phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác đến nơi mà nó được liên kết. Một loại của vector là "plasmid", mà dùng để chỉ vòng ADN mạch kép hình tròn mà các mảnh ADN khác có thể được nối vào. Loại khác của vector là vector virus, trong đó các mảnh ADN khác có thể được nối vào hệ gen virus. Vector nhất định có khả năng tự sao chép trong tế bào chủ mà chúng được đưa vào (ví dụ, vector vi khuẩn có điểm mở đầu sao chép vi khuẩn và vector động vật có vú thể bổ sung). Vector khác (ví dụ, vector động vật có vú không

phải thể bổ sung) có thể được kết hợp vào hệ gen của tế bào chủ khi được đưa vào trong tế bào chủ, và vì thế được sao chép cùng với hệ gen vật chủ. Ngoài ra, vector nhất định có khả năng định hướng sự biểu hiện của gen mà chúng là liên kết với theo cách có điều khiển. Vector này được gọi là "vector biểu hiện tái tổ hợp" (hoặc đơn giản là, "vector biểu hiện"). Nhìn chung, vector biểu hiện mong muốn trong kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường ở dạng plasmit. Trong bản mô tả này, "plasmit" và "vector" có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau vì plasmit là dạng vector thường được sử dụng nhất. Tuy nhiên, sáng chế nhằm bao gồm các dạng khác của vector biểu hiện, như vector virus (ví dụ, các retrovirus, adenovirus và các virus liên quan đến adeno sao chép lỗi), mà có các chức năng tương đương.

Thuật ngữ "tế bào chủ tái tổ hợp" (hoặc đơn giản là "tế bào chủ") gồm tế bào mà vector biểu hiện tái tổ hợp đã được đưa vào. Cần hiểu rằng thuật ngữ này nhằm để chỉ tế bào cụ thể mà còn dùng để chỉ con cháu của tế bào đó. Vì cải biến nhất định có thể xuất hiện trong các thế hệ tiếp theo do đột biến hoặc ảnh hưởng của môi trường, thực tế là thế hệ con cháu có thể không giống hệt tế bào bố mẹ, nhưng vẫn thuộc phạm vi của thuật ngữ "tế bào chủ" trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" (kháng thể đơn dòng) chỉ kháng thể, hoặc quần thể của các kháng thể tương tự, thu được từ quần thể của các kháng thể về cơ bản đồng nhất, và không được hiểu là đòi hỏi sự sản xuất kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể đơn dòng có thể được tạo ra bằng phương pháp lai được mô tả lần đầu tiên bởi Kohler và Milstein (*Nature*, 256: 495-497, 1975), hoặc bằng các phương pháp ADN tái tổ hợp.

Thuật ngữ "kháng thể khảm" (hoặc "globulin miễn dịch khảm") dùng để chỉ phân tử gồm chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ mà giống hệt với hoặc tương đồng với trình tự tương ứng trong các kháng thể thu được từ loài cụ thể hoặc thuộc vào nhóm hoặc phân nhóm kháng thể cụ thể, trong khi phần còn lại của (các) chuỗi giống hệt với hoặc tương đồng với trình tự tương ứng trong các kháng thể thu được từ loài khác hoặc thuộc vào nhóm hoặc phân nhóm kháng thể khác, cũng như mảnh của các kháng thể này, miễn là chúng thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn (Cabilly et al. (1984), *infra*; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851).

Thuật ngữ “kháng thể được làm giống người” chỉ dạng kháng thể có trình tự từ các kháng thể không phải ở người (ví dụ, ở chuột) cũng như các kháng thể ở người. Kháng thể được làm giống người có thể gồm sự thể axit amin bảo toàn hoặc các gốc không tự nhiên từ cùng loài hoặc các loài khác nhau mà thay đổi không đáng kể liên kết và/hoặc hoạt tính sinh học của nó. Các kháng thể này là các kháng thể khảm có trình tự tối thiểu thu được từ globulin miễn dịch không phải ở người. Đối với phần lớn kháng thể, các kháng thể được làm giống người là globulin miễn dịch ở người (kháng thể thể nhận) trong đó các gốc từ vùng quyết định bổ thể (CDR) của thể nhận được thay thế bởi các gốc từ CDR của loài không phải người (thể cho kháng thể) như chuột nhắt, chuột, lạc đà, bò, dê, hoặc thỏ có các tính chất mong muốn. Ngoài ra, các kháng thể được làm giống người có thể gồm các gốc mà được tìm thấy trong kháng thể thể nhận hoặc trong trình tự CDR được nhập vào hoặc trình tự khung hoạt động. Các cải biến này được tạo ra để xác định thêm và tối ưu hóa tính năng kháng thể. Như vậy, nhìn chung, kháng thể được làm giống người sẽ gồm tất cả hoặc về cơ bản là tất cả của ít nhất một, và trong một trong hai khía cạnh, miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc về cơ bản là tất cả vòng siêu biến tương ứng với vòng siêu biến của globulin miễn dịch không phải ở người và tất cả hoặc về cơ bản là tất cả các vùng FR là của trình tự globulin miễn dịch ở người. Kháng thể được làm giống người tùy chọn còn bao gồm ít nhất một phần của vùng không đổi globulin miễn dịch (Fc), hoặc một phần của globulin miễn dịch ở người (xem, ví dụ, Cabilly et al., Patent Mỹ số 4,816,567; Cabilly et al., patent châu Âu số 0,125,023 B1; Boss et al., Patent Mỹ số 4,816,397; Boss et al., patent châu Âu số 0,120,694 B1; Neuberger, M. S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M. S. et al., patent châu Âu số 0,194,276 B1; Winter, Patent Mỹ số 5,225,539; Winter, patent châu Âu số 0,239,400 B1; Padlan, E. A. et al., đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số 0,519,596 A1; Queen et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 86:10029-10033).

Mỗi kháng thể được mô tả và được yêu cầu bảo hộ ở đây có thể được đề cập đến, ở dạng số ít hoặc số nhiều, như: “kháng thể kháng OX40;” “kháng thể kháng hOX40;” “kháng thể đơn dòng kháng hOX40;” “kháng thể kháng OX40 của người;” “mAb kháng OX40 của người;” “ mAb kháng hOX40” “kháng thể đơn dòng đặc hiệu hOX40;” “kháng thể kháng OX40L;” “kháng thể kháng hOX40L;”

“kháng thể kháng OX40L ở người;” “kháng thể đặc hiệu OX40 ở người;” “kháng thể đơn dòng đặc hiệu OX40 ở người;” “kháng thể đặc hiệu OX40 ở người;” “kháng thể đặc hiệu kháng OX40 của người;” “kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng OX40 của người;” “kháng thể đặc hiệu h-OX40;” “kháng thể đơn dòng đặc hiệu h-OX40;” “kháng thể chủ vận hOX40;” “chất đối kháng hOX40” và/hoặc sự cải biến tương tự khác của chúng.

Như được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 11/659,266 có tên là "Phương pháp điều trị tình trạng bệnh bằng cách gây ảnh hưởng đến việc truyền tín hiệu của thụ thể OX-40 và phương pháp sàng lọc hiệu suất cao và nhận diện chất nền của chúng", tài liệu này bộc lộ rằng chức năng của OX40L là điều hòa âm tính sự tạo thành tế bào Tr1 được kích thích bởi chất ức chế miễn dịch Dex và vit D3, ICOSL, hoặc DC chưa trưởng thành. Nội dung bộc lộ này chứng tỏ cơ chế chung mà bằng cơ chế này OX40L tăng cường khả năng gây miễn dịch và phá vỡ sự dung nạp miễn dịch.

Bằng cách sử dụng phân tích miễn dịch mô (Fig. 1), nhuộm màu nội bào (Fig. 2), và chọn lọc tế bào (Fig. 3), các tác giả sáng chế đã thể hiện được rằng cả hai Treg sản xuất ICOS⁺IL-10 và sản xuất ICOS-TGF- β xâm nhập vào mô FL người. Các Treg Foxp3⁺ có nguồn gốc từ FL có thể ức chế mạnh sự tăng sinh của tế bào T thâm nhập khối u FOXP3⁺CD4⁺CD25⁻ để đáp lại tế bào u lympho tự sinh được hoạt hoá trước phối tử CD40⁻ (Fig. 4). Hoạt tính ức chế của Treg ICOS⁺ có thể bị phong bế một phần bằng cách trung hoà kháng thể kháng IL-10, xác nhận vai trò của ICOS⁺IL-10 tạo ra Treg trong FL (Fig. 4). Trong thử nghiệm trên Fig. 2, các tế bào khối u và PBMC thu được từ 7 bệnh nhân với chẩn đoán ban đầu trước khi trị liệu. PBMC cũng thu được từ 7 thể cho khỏe mạnh để so sánh. Tỷ lệ phần trăm của tế bào T điều hoà trên tổng số tế bào T CD4⁺ được xác định bằng phân tích bào kế chảy của Treg CD4⁺CD25⁺CD127^{thấp}Foxp3⁺. Fig. 2A thể hiện phân tích FACS đại diện của Treg, trong khi Fig. 2B thể hiện tỷ lệ phần trăm của Treg của tất cả thể cho.

Cũng đã phát hiện ra rằng OX40L ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 từ tế bào T CD4⁺ được kích thích bởi Dex và vit D3. Đã biết rằng hỗn hợp của các chất ức chế

miễn dịch Dex và vit D3 nhất quán gây ra sự biệt hóa của tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm thành các tế bào Tr1. Để nghiên cứu liệu OX40L có thể ức chế sự tạo thành và chức năng của các tế bào Tr1, tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm được nuôi cấy với kháng thể đơn dòng kháng CD3 cộng với kháng thể đơn dòng kháng CD28 trong sự có mặt hoặc vắng mặt của các tế bào L được chuyển nhiễm OX40L trong bốn điều kiện nuôi cấy khác nhau gồm: (1) Tr1 (Dex và vit D3); (2) TH1 (IL-12); (3) TH2 (IL-4); hoặc (4) trung tính (chỉ môi trường nuôi cấy) trong 7 ngày (Fig. 5A). Sự sản xuất IL-10 bằng tế bào T được mỗi được phân tích bằng nhuộm màu nội bào xytokin và ELISA.

Trong các thử nghiệm của Fig. 5A, phân tích nội bào của xytokin được sản xuất bằng tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm được thực hiện bằng bào kế chảy. Tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm được nuôi cấy với kháng thể đơn dòng kháng CD3 và kháng CD28 trong điều kiện có mặt IL-2 trên các tế bào L bố mẹ hoặc các tế bào OX40L-L với xytokin tái tổ hợp được thể hiện hoặc chất phản ứng trong 7 ngày. Tỷ lệ phần trăm của tế bào T sản xuất xytokin tương ứng được biểu thị trong mỗi profin điểm. Kết quả thể hiện rằng OX40L ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 từ tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm được kích thích bởi các tín hiệu phân cực khác nhau. Như được thể hiện trên Fig. 5A, từ 2% đến 4% tế bào Tr1 được tạo ra từ tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm được nuôi cấy trong điều kiện trung tính hoặc TH1 hoặc TH2. Nhiều hơn 15% tế bào Tr1 được tạo ra trong môi trường nuôi cấy với Dex cộng với vit D3. OX40L bổ sung phong bế hoàn toàn sự tạo thành tế bào Tr1, trong khi kích thích sự tạo thành của tế bào T sản xuất TNF- α trong tất cả điều kiện nuôi cấy.

Các dữ liệu này được xác nhận bởi dữ liệu ELISA (Fig. 5B). Trong các thử nghiệm của Fig. 5B, xytokin được sản xuất bằng các tế bào chưa qua thí nghiệm CD4⁺ trong phần dịch nổi sau khi tái kích thích bằng kháng thể đơn dòng kháng CD3 và kháng CD28 trong 24 giờ được xác định bằng ELISA. Tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm được nuôi cấy với kháng thể đơn dòng kháng CD3 và kháng CD28 trong điều kiện có mặt IL-2 trên các tế bào L bố mẹ hoặc các tế bào OX40L-L với xytokin tái tổ hợp được thể hiện hoặc chất phản ứng trong 7 ngày. Dữ liệu được thể hiện là giá trị trung bình $\pm$ sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình (SEM) của bốn

thử nghiệm độc lập. Kết quả thể hiện rằng OX40L ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 từ tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm được kích thích bởi các tín hiệu phân cực khác nhau.

Tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm bắt đầu với điều kiện Tr1 (Dex cộng với vit D3) không dị ứng và có khả năng ức chế sự tăng sinh của tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm để đáp lại kháng thể đơn dòng kháng CD3 cộng với kháng CD28 (Fig. 5C). Trong các thử nghiệm của Fig. 5C, chức năng kìm hãm trong tế bào T được xác định bởi sự kết hợp [³H]thymidin. Hỗn hợp của quần thể tế bào T được thể hiện được kích thích lại bởi kháng thể đơn dòng kháng CD3 và kháng CD28. Cột sai số biểu thị SEM của các giếng có ba bản giống nhau. Đã bộc lộ rằng tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm bắt đầu với cùng điều kiện Tr1 trong điều kiện có mặt OX40L được tăng sinh mạnh và thất bại trong việc ức chế sự tăng sinh của tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm để đáp lại kháng thể đơn dòng kháng CD3 cộng với kháng CD28. Dữ liệu cho thấy rằng OX40L phong bế sự tạo thành tế bào Tr1 chức năng từ tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm được kích thích bởi Dex và vit D3.

Đã bộc lộ rằng các tế bào Tr1 có thể được tạo ra từ tế bào T CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ ghi nhớ, và rằng OX40L có thể ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 từ tế bào T CD4⁺ ghi nhớ. Tế bào T CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ ghi nhớ được nuôi cấy trong 7 ngày với kháng thể đơn dòng kháng CD3 cộng với kháng CD28 trong sự có mặt hoặc vắng mặt của điều kiện Tr1 các tế bào L được chuyển nhiễm OX40L (Dex cộng với vit D3). Trong các thử nghiệm của Fig. 6A, phân tích nội bào của xytokin được sản xuất bằng tế bào T CD4⁺ ghi nhớ được thực hiện bằng bào kế chảy. Tế bào T CD4⁺CD45RO⁺CD25⁻ ghi nhớ được nuôi cấy với kháng thể đơn dòng kháng CD3, kháng CD28, và IL-2 trên các tế bào L bố mẹ hoặc các tế bào OX40L-L trong sự có mặt hoặc vắng mặt của Dex cộng với vit D3 trong 7 ngày. Tỷ lệ phần trăm của tế bào T sản xuất xytokin tương ứng được biểu thị trong mỗi profin điểm. Kết quả thể hiện rằng OX40L ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 từ tế bào T CD4⁺ ghi nhớ trong điều kiện Dex cộng với vit D3. Fig. 6A thể hiện rằng số lượng lớn các tế bào Tr1 (>20%) được tạo ra từ tế bào T CD4⁺ ghi nhớ trong môi trường nuôi cấy với Dex cộng với vit D3. OX40L bổ sung phong bế hoàn toàn sự tạo thành tế bào Tr1 và thúc đẩy sự tạo thành tế bào sản xuất TNF- α từ tế bào T CD4⁺ ghi nhớ.

Khả năng của Dex cộng với vit D3 để thúc đẩy sự sản xuất IL-10 từ tế bào T CD4⁺ ghi nhớ, và rằng khả năng này có thể bị ức chế bởi OX40L, được xác nhận bằng phân tích ELISA IL-10 (Fig. 6B). Trong các thử nghiệm của Fig. 6B, sự sản xuất IL-10 bằng tế bào T CD4⁺ ghi nhớ được xác định trong phần dịch nổi sau khi tái kích thích bằng kháng thể đơn dòng kháng CD3 và kháng CD28 trong 24 giờ bằng ELISA. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM của bốn thử nghiệm độc lập. Kết quả thể hiện rằng OX40L ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 từ tế bào T CD4⁺ ghi nhớ trong điều kiện Dex cộng với vit D3.

Cũng phát hiện ra thêm rằng OX40L ức chế sự tạo thành tế bào Tr1, trong khi thành phần họ TNF khác (GITRL và 4-1BBL) thì không. Trong siêu họ TNF, OX40L, glucocorticoid bị kích ứng bởi phối tử- thụ thể TNF (GITRL), và phối tử 4-1BB (4-1BBL) có chức năng kích thích đối với tế bào T. Để nghiên cứu xem liệu OX40L có phải là duy nhất về tác dụng ức chế của các tế bào Tr1, tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm được nuôi cấy với kháng thể đơn dòng kháng CD3 cộng với kháng CD28 với Dex cộng với vit D3, với các tế bào L bố mẹ hoặc các tế bào L được chuyển nhiễm với OX40L, GITRL, hoặc 4-1BBL trong 7 ngày. Trong khi OX40L, GITRL, và 4-1BBL đều thúc đẩy sự tạo thành tế bào sản xuất TNF- α , chỉ OX40L ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 (các Fig. 7A và Fig. 7B).

Trong các thử nghiệm của Fig. 7A, phân tích nội bào của xytokin được sản xuất bằng tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm được thực hiện bằng bào kế chảy. Tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm được nuôi cấy với kháng thể đơn dòng kháng CD3, kháng CD28, và IL-2 trên các tế bào L bố mẹ, các tế bào OX40L-L, các tế bào GITRL-L, hoặc các tế bào 4-1BBL-L trong điều kiện có mặt Dex cộng với vit D3 trong 7 ngày. Tỷ lệ phần trăm của tế bào T sản xuất xytokin tương ứng được biểu thị trong mỗi profin điểm. Kết quả thể hiện rằng OX40L nhưng GITRL và 4-1BBL đều không ức chế sự tạo thành tế bào Tr1.

Trong các thử nghiệm của Fig. 7B, IL-10 được sản xuất bởi các tế bào chưa qua thí nghiệm CD4⁺ được xác định trong phần dịch nổi sau khi tái kích thích bằng kháng thể đơn dòng kháng CD3 và kháng CD28 trong 24 giờ bằng ELISA. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM của bốn thử nghiệm độc lập. Kết

qua thể hiện rằng OX40L nhưng GITRL và 4-1BBL đều không ức chế sự tạo thành tế bào Tr1.

OX40L, GITRL, và 4-1BBL cùng thúc đẩy sự giãn nở tổng số lượng tế bào T (Fig. 7C). Trong các thử nghiệm của Fig. 7C, số lượng của tế bào T sống được đếm. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM của bốn thử nghiệm độc lập.

Như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng, kết quả của các Fig. 7A, Fig. 7B, và Fig. 7C thể hiện rằng OX40L, nhưng không phải là GITRL và 4-1BBL, ức chế sự tạo thành tế bào Tr1. Dữ liệu này cho thấy rằng trong số ba thành viên của siêu họ TNF đã biết là đồng kích thích tế bào T, OX40L có chức năng mới và duy nhất trong việc ức chế sự tạo thành tế bào Tr1.

Cũng phát hiện ra thêm rằng OX40L ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 được kích thích bởi ICOSL hoặc DC chưa trưởng thành. ICOS và CD28 biểu thị hai thụ thể đồng kích thích dương trong họ CD28 được biểu hiện trên tế bào T. Việc truyền tín hiệu qua ICOS bởi các kháng thể chủ vận hoặc ICOSL đã chứng tỏ để thúc đẩy tế bào T CD4⁺ để sản xuất IL-10. Để nghiên cứu xem liệu OX40L có thể ức chế khả năng của ICOS gây ra sự sản xuất IL-10 bằng tế bào T CD4⁺, tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm và ghi nhớ được nuôi cấy với kháng CD3 trong điều kiện có mặt các tế bào L được chuyển nhiễm ICOSL, hoặc các tế bào L được chuyển nhiễm ICOSL trong điều kiện có mặt OX40L trong 7 ngày.

Trong các thử nghiệm của Fig. 8A, phân tích nội bào của xytokin được sản xuất bằng tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm được thực hiện bằng bào kế chảy. Tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm được nuôi cấy trong 7 ngày trên các tế bào L bố mẹ, trên hỗn hợp của các tế bào ICOSL-L và các tế bào L, hoặc trên hỗn hợp của các tế bào ICOSL-L và các tế bào OX40L-L, mà được phủ trước bằng kháng thể đơn dòng kháng CD3. Tỷ lệ phần trăm của tế bào T sản xuất xytokin tương ứng được biểu thị trong mỗi profin điểm. Kết quả thể hiện rằng OX40L ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 từ tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm được kích thích bởi ICOSL.

Trong các thử nghiệm của Fig. 8B, sự sản xuất IL-10 bởi các tế bào chưa qua thí nghiệm CD4⁺ được xác định trong phần dịch nổi sau khi tái kích thích bằng kháng thể đơn dòng kháng CD3 và kháng CD28 trong 24 giờ được xác định bằng ELISA. Tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm được nuôi cấy trong 7 ngày trên các tế bào L bố mẹ, trên hỗn hợp của các tế bào ICOSL-L và các tế bào L, hoặc trên hỗn hợp của các tế bào ICOSL-L và các tế bào OX40L-L, mà được phủ trước bằng kháng thể đơn dòng kháng CD3. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM của ba thử nghiệm độc lập. Kết quả thể hiện rằng OX40L ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 từ tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm được kích thích bởi ICOSL.

Trong các thử nghiệm của Fig. 8C, phân tích nội bào của xytokin được sản xuất bằng tế bào T CD4⁺ ghi nhớ được thực hiện bằng bào kế chảy. Tế bào T CD4⁺ ghi nhớ được nuôi cấy trong 7 ngày trên các tế bào L bố mẹ, trên hỗn hợp của các tế bào ICOSL-L và các tế bào L, hoặc trên hỗn hợp của các tế bào ICOSL-L và các tế bào OX40L-L, mà được phủ trước bằng kháng thể đơn dòng kháng CD3. Tỷ lệ phần trăm của tế bào T sản xuất xytokin tương ứng được biểu thị trong mỗi profin điểm. Kết quả thể hiện rằng OX40L ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 từ tế bào T CD4⁺ ghi nhớ được kích thích bởi ICOSL.

Trong các thử nghiệm của Fig. 8D, sự sản xuất IL-10 bằng tế bào T CD4⁺ ghi nhớ trong phần dịch nổi sau khi tái kích thích bằng kháng thể đơn dòng kháng CD3 và kháng CD28 trong 24 giờ được xác định bằng ELISA. Tế bào T CD4⁺ ghi nhớ được nuôi cấy trong 7 ngày trên các tế bào L bố mẹ, trên hỗn hợp của các tế bào ICOSL-L và các tế bào L, hoặc trên hỗn hợp của các tế bào ICOSL-L và các tế bào OX40L-L, mà được phủ trước bằng kháng thể đơn dòng kháng CD3. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM của ba thử nghiệm độc lập. Kết quả thể hiện rằng OX40L ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 từ tế bào T CD4⁺ ghi nhớ được kích thích bởi ICOSL.

Kết quả của các thử nghiệm trên các Fig. 8A, Fig. 8B, Fig. 8C, và Fig. 8D thể hiện rằng ICOSL thúc đẩy đáng kể sự tạo thành tế bào Tr1 từ cả hai tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm và ghi nhớ. OX40L bổ sung ức chế hoàn toàn sự tạo

thành tế bào Tr1 từ cả hai tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm và ghi nhớ, trong khi kích thích mạnh sự tạo thành tế bào sản xuất TNF- α .

Đã biết rằng DC chưa trưởng thành hoặc DC đã được điều trị bằng IFN- α hoặc IL-10 có thể làm cho tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm biệt hóa thành các tế bào Tr1. Đã có nghiên cứu về việc liệu OX40L có thể ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 được kích thích bởi DC hay không. Như được thể hiện trên Fig. 8E, DC chưa trưởng thành hoặc DC đã được điều trị bằng IL-10 hoặc IFN- α tất cả được kích thích bởi sự tạo thành của nhiều hơn 10% của các tế bào Tr1 từ tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm. Trái lại, DC được hoạt hóa bởi CD40L gây ra đáp ứng TH1 mạnh, kèm theo sự tạo thành của khoảng 3% tế bào Tr1. Việc bổ sung OX40L tái tổ hợp trong dịch nuôi cấy tế bào DC-T ức chế hoàn toàn sự tạo thành tế bào Tr1 được kích thích bởi DC chưa trưởng thành và DC đã được điều trị bằng IL-10 và IFN- α . Ngoài ra, OX40L cũng ức chế sự tạo thành của số lượng dư của các tế bào Tr1 được kích thích bởi DC trưởng thành được hoạt hóa CD40L. Trong các thử nghiệm của Fig. 8E, phân tích nội bào của xytokin được sản xuất bằng tế bào T chưa qua thí nghiệm CD4⁺ được thực hiện bằng bào kế chảy. Tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm được đồng nuôi cấy trong sự có mặt hoặc vắng mặt của OX40L tái tổ hợp hòa tan trong 7 ngày với DC chưa trưởng thành hoặc DC được nuôi cấy với IFN- α , IL-10, và CD40L. Tỷ lệ phần trăm của tế bào T sản xuất xytokin tương ứng được biểu thị trong mỗi profin điểm. Kết quả thể hiện rằng OX40L ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 từ tế bào T CD4⁺ được kích thích bởi DC.

Khả năng của OX40L để ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 được kích thích bởi DC được xác nhận bởi dữ liệu ELISA (Fig. 8F). Trong các thử nghiệm của Fig. 8F, sự sản xuất IL-10 bởi các tế bào chưa qua thí nghiệm CD4⁺ được xác định trong phần dịch nổi sau khi tái kích thích bằng kháng thể đơn dòng kháng CD3 và kháng CD28 trong 24 giờ bằng ELISA. Tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm được đồng nuôi cấy trong sự có mặt hoặc vắng mặt của OX40L tái tổ hợp hòa tan trong 7 ngày với DC chưa trưởng thành hoặc DC được nuôi cấy với IFN- α , IL-10, và CD40L. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM của ba thử nghiệm độc lập. Kết quả thể hiện rằng OX40L ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 từ tế bào T CD4⁺ được kích thích bởi DC. Như vậy, dữ liệu này chứng tỏ rằng OX40L có thể ức chế sự tạo

thành tế bào Tr1 được kích thích bởi tín hiệu sinh lý hơn được cung cấp bởi ICOSL và DC.

Đã từng có gợi ý rằng tế bào T điều hoà được thể hiện ở mức độ cao trong diện tích của u lympho không phải dạng Hodgkin tế bào B và rằng tế bào B là có liên quan đến sự tuyển chọn của tế bào T điều hoà vào diện tích của u lympho. Đã có nghiên cứu về việc liệu sự ảnh hưởng việc truyền tín hiệu thụ thể OX40, như bởi OX40L, có thể mang lại phép trị liệu chống lại u lympho tế bào B. Mẫu được bảo quản cryo từ bệnh nhân u lympho tế bào B được sử dụng để đánh giá khả năng của OX40L để làm ngừng hoạt động các tế bào Tr1. Mẫu được sử dụng là u lympho có nang thu được từ mẫu lá lách trước khi thực hiện việc điều trị bất kỳ. Các tế bào được làm tan, bằng 400×10^6 các tế bào được làm đông lạnh mang lại 127×10^6 tế bào sống và $33,9 \times 10^6$ tế bào chết (khả năng sống sót 79%). Số lượng đủ của các tế bào $CD25^+$ được xác định bằng cách nhuộm màu FACS. Trong các thử nghiệm của Fig. 9, sự tiết IL-10 của Treg sản xuất ICOS⁺IL-10 được xác định bằng ELISA. Các tế bào Treg được nuôi cấy trong hai điều kiện khác nhau. Trong điều kiện 1, các tế bào $CD25^+$ /ICOS⁺ được nuôi cấy với kháng CD3 trong điều kiện có mặt IL-2 (900 μ l/ml) trên các tế bào L bố mẹ hoặc các tế bào OX40L-L với kháng thể kháng ICOS trong 3-6 ngày. Trong điều kiện 2, các tế bào $CD25^+$ /ICOS⁺ được nuôi cấy với kháng CD3 trong điều kiện có mặt IL-2 (900 μ l/ml) trên các tế bào ICOS-L-L hoặc hỗn hợp của các tế bào OX40L-L và các tế bào ICOS-L-L trong từ 3 đến 6 ngày. Sự sản xuất xytokin trong phản dịch nổi được xác định bằng ELISA. Kết quả thể hiện rằng OX40L ức chế mạnh sự sản xuất IL-10 bởi các tế bào Treg.

Việc phát hiện ra rằng OX40L có khả năng ức chế sự tạo thành và chức năng của các tế bào Tr1 được kích thích bởi các chất ức chế miễn dịch Dex cộng với vit D3, ICOSL, hoặc DC, làm nổi bật cơ chế mới mà bằng cơ chế này OX40L thúc đẩy khả năng gây miễn dịch và phá vỡ sự dung nạp trong các dạng khác nhau của đáp ứng miễn dịch được điều tiết bởi CD4- hoặc CD8, như sẽ được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Khả năng của OX40L để ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 trong khi cả hai đáp ứng TH1 được kích thích bởi IL-12 hoặc TH2 được kích thích bởi IL-4 cho thấy rằng OX40L có thể điều khiển độ lớn của đáp ứng miễn dịch được điều tiết bởi TH1 hoặc TH2. Ngoài ra, khả năng của

OX40L để ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 tính chất độc nhất của OX40L, vì hai thành phần khác của họ TNF GITRL và 4-1BBL không có tính chất chức năng. Hơn nữa, khả năng của OX40L để ức chế sự sản xuất IL-10 bởi các tế bào Treg I xác định OX40L là có khả năng điều trị u lympho tế bào B và các bệnh ung thư khác.

Nhiều phân tử đã được nhận diện rằng thúc đẩy sự tạo thành tế bào Tr1, gồm IL-10, IFN- α , ICOSL, và hợp chất ức chế miễn dịch như Dex cộng với vit D3. OX40L biểu thị khả năng ức chế sự tạo thành các tế bào Tr1 không chỉ từ tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm, mà còn từ tế bào T CD4⁺ ghi nhớ và tế bào T điều hòa. Tính chất mới này của OX40/OX40L có thể giải thích báo cáo gần đây rằng việc truyền tín hiệu OX40 cho phép tế bào T tự phản ứng không dị ứng để đạt được các chức năng tế bào tác động. Việc hướng đích OX40/OX40L như vậy mang lại việc điều trị cho các bệnh dị ứng và tự miễn ở người và cũng như đối với sự phát triển của việc điều trị các bệnh lây nhiễm và ung thư ở người bao gồm nhưng không giới hạn ở u melanin, ung thư não, ung thư xương, bệnh bạch cầu, u lympho, ung thư có nguồn gốc từ tế bào biểu mô (carcinom biểu mô) như carcinom tế bào nền, adenocarcinom, ung thư dạ dày-ruột như ung thư môi, ung thư mồm, ung thư thực quản, ung thư ruột non và ung thư dạ dày, ung thư ruột kết, ung thư gan, ung thư bàng quang, ung thư tụy, ung thư buồng trứng, ung thư cổ, ung thư phổi, ung thư vú và ung thư da, như ung thư tế bào vảy và tế bào nền, ung thư tuyến tiền liệt, carcinom tế bào thận, và các bệnh ung thư đã biết khác.

Các rối loạn hoặc tình trạng bệnh mà có thể được ngăn ngừa hoặc được điều trị bằng các kháng thể và các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này gồm việc ngăn ngừa hoặc việc điều trị ung thư, như bệnh bạch cầu tế bào T da, khối u đầu và cổ, ung thư tụy, ung thư bàng quang, u thần kinh đệm cấp độ cao, di căn não, u melanin, ung thư da, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư ruột kết, bệnh bạch cầu, hội chứng loạn sản tủy (tình trạng bệnh tiền bệnh bạch cầu), và đa u tủy. Nhìn chung, sự di căn của bệnh ung thư bất kỳ có thể được ngăn ngừa hoặc được điều trị bằng cách ghép và các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Các kháng thể cũng có thể được sử dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị tình trạng bệnh tăng sinh tạo mạch gồm chứng giãn mao mạch, u tĩnh mạch, u nguyên bào mạch máu. Các rối loạn, bệnh hoặc tình trạng bệnh khác bao gồm bệnh do virus,

một số bệnh trong đó thường được coi là "không chữa được." Các kháng thể, ví dụ, cũng có thể được sử dụng để phân loại các chủng của một tác nhân gây bệnh. Các nhà nghiên cứu có thể sử dụng các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này để xác định và để phát hiện ra các tế bào hoặc phân tử cụ thể trong sinh vật.

Nói chung, thuật ngữ "bệnh ung thư" và "ung thư" dùng để chỉ hoặc mô tả tình trạng bệnh sinh lý ở động vật có vú mà thường đặc trưng ở chỗ sự sinh trưởng tế bào không được điều hòa. Cụ thể hơn, bệnh ung thư mà có thể được điều trị hoặc ngăn ngừa bằng cách sử dụng một hoặc nhiều kháng thể bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này hoặc biến thể của chúng, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, carcinom, u lympho, u nguyên bào, bệnh sacôm, và bệnh bạch cầu. Ví dụ cụ thể hơn về các bệnh ung thư này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, ung thư tế bào vảy, ung thư phổi (gồm ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư phổi tế bào không nhỏ, adenocarcinom của phổi, và carcinom tế bào vảy của phổi), ung thư màng bụng, ung thư tế bào gan, ung thư dạ dày hoặc ung thư bụng (gồm ung thư dạ dày-ruột và ung thư chất đệm dạ dày-ruột), ung thư tụy, u nguyên bào xóp, ung thư cổ, ung thư buồng trứng, ung thư gan, ung thư bàng quang, ung thư gan, ung thư vú, ung thư ruột kết, ung thư ruột kết-trực tràng, carcinom nội mạc tử cung hoặc carcinom tử cung, carcinom tuyến nước bọt, ung thư thận hoặc thuộc thận, ung thư gan, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư âm hộ, ung thư tuyến giáp, carcinom gan và các loại khác nhau của ung thư đầu và cổ, u melanin, u melanin lan bề mặt, u melanin nốt ruồi ác tính, u melanin nốt chấm bên ngoài, u melanin dạng kết hạch, cũng như u lympho tế bào B (gồm u lympho cấp độ thấp/có nang không phải dạng Hodgkin (NHL); NHL lympho bào nhỏ (SL); NHL cấp độ trung bình/có nang; NHL khuếch tán cấp độ trung bình; NHL nguyên bào miễn dịch cấp độ cao; NHL nguyên bào limphô cấp độ cao; NHL tế bào không bị chia cắt nhỏ cấp độ cao; NHL bệnh không lồ; u lympho tế bào vỏ não; u lympho liên quan đến AIDS; và Macroglobulin huyết Waldenstrom); bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (CLL); bệnh bạch cầu nguyên bào limphô cấp tính (ALL); bệnh bạch cầu tế bào lông; bệnh bạch cầu nguyên tủy bào mạn tính; và rối loạn tăng sinh tế bào lympho sau cấy ghép (PTLD), cũng như sự tăng sinh mạch bất thường có liên quan đến u thần kinh-ngoại bì, bệnh phù (như có liên quan đến khối u não), và hội chứng Meigs.

Các phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn miễn dịch cũng được đề xuất trong bản mô tả này. Các phương pháp này bao gồm việc sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể cho đối tượng cần điều trị. Theo một số phương án, rối loạn miễn dịch là rối loạn miễn dịch hoặc bệnh về hệ tự miễn. Rối loạn này là bệnh hen, viêm da dị ứng, viêm mi dị ứng, bệnh viêm ruột, bệnh xơ cứng rải rác, GVHD, và/hoặc luput ban đỏ toàn thân. Theo một số phương án, rối loạn là bệnh có liên quan đến virus, vi khuẩn hoặc chất gây nhiễm khác.

Hơn nữa, các kháng thể và các phương pháp mà được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh viêm và tình trạng bệnh, như bệnh viêm xương khớp, viêm khớp dạng thấp, bệnh Crohn, viêm ruột kết mạn loét, và bệnh tự miễn như bệnh tự miễn luput và hỗn hợp. Ví dụ, các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có thể là hữu dụng trong việc điều trị một số bệnh tự miễn và bệnh viêm bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu để trị liệu của kháng thể cho đối tượng cần thiết, trong đó bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm là một hoặc nhiều bệnh bất kỳ trong số các bệnh sau: bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin (insulin-dependent diabetes mellitus: IDDM), bệnh đái tháo đường, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh viêm não tủy tự miễn thử nghiệm, bệnh viêm não tủy rải rác cấp, viêm khớp, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp tự miễn thử nghiệm, bệnh nhược cơ năng, viêm tuyến giáp, bệnh Hashimoto, chứng phù niêm nguyên phát, chứng nhiễm độc do tuyến giáp, bệnh thiếu máu ác tính, viêm dạ dày teo tự miễn, bệnh Addison, bệnh mãn kinh sớm, chứng vô sinh ở nam giới, bệnh đái đường vị thành niên, hội chứng Goodpasture, bệnh pemphigut thông thường, dạng pemphigut, viêm mắt đồng cảm, viêm màng mạch nho thủy tinh thể, bệnh thiếu máu tan huyết tự miễn, bệnh giảm bạch cầu tự phát, xơ gan mật nguyên phát, bệnh viêm gan mạn tính hoạt tính Hb_{s-ve}, xơ gan không rõ nguồn gốc, viêm ruột kết mạn loét, hội chứng Sjogren, bệnh cứng bì, bệnh u hạt Wegener, bệnh viêm bì cơ/đa bì cơ, LE hình đĩa, luput ban đỏ toàn thân, bệnh Chron, bệnh vẩy nến, Viêm cứng khớp đốt sống, hội chứng kháng thể kháng phospholipit, chứng thiếu máu không tái tạo, bệnh viêm gan tự miễn, bệnh Coeliac, bệnh Graves, hội chứng Guillain-Barre (Guillain-Barre syndrome: GBS), ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát, hội chứng giật rung cơ lác rung giật mắt (Opsoclonus myoclonus syndrome: OMS), viêm thần kinh thị giác, viêm tuyến giáp

ORd, Pemphigut, viêm đa khớp, xơ gan mật nguyên phát, hội chứng Reiter, hội chứng Takayasu, chứng viêm động mạch thái dương, bệnh thiếu máu tan huyết tự miễn Warm, bệnh u hạt Wegener, bệnh ngứa mẩn toàn thân rụng lông, bệnh Behcet, bệnh Chagas, hội chứng mệt mỏi mạn tính, chứng loạn thần kinh sinh dưỡng, bệnh lạc nội mạc tử cung, chứng nhiễm trùng viêm tuyến mô hôi, viêm bàng quang kẽ, chứng tăng trương lực cơ thần kinh, bệnh sacoit, bệnh cứng bì, viêm ruột kết mạn loét, bệnh bạch biến, chứng đau âm hộ mạn tính, bệnh viêm da, viêm da tiếp xúc dị ứng, viêm dạ dày *H. pylory*, bệnh viêm mũi mạn tính, bệnh xơ cứng động mạch và bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ.

Cụ thể hơn, “bệnh tự miễn” được đề cập đến trong bản mô tả này là bệnh hoặc rối loạn xuất hiện và hướng đến việc chống lại mô hoặc cơ quan của cá thể hoặc sự đồng xuất hiện hoặc tách riêng của chúng hoặc dẫn đến tình trạng bệnh từ đó. Bệnh tự miễn có thể chỉ tình trạng bệnh là kết quả từ, hoặc bị trầm trọng thêm bởi, sự sản xuất kháng thể bằng tế bào B mà phản ứng với mô và kháng nguyên cơ thể bình thường. Ngoài ra, bệnh tự miễn là bệnh mà có thể tham gia vào sự tiết của tự kháng thể mà là đặc hiệu đối với epitop từ kháng nguyên tự thân (ví dụ, kháng nguyên nhân).

Các bệnh hoặc rối loạn tự miễn mà có thể điều trị và/hoặc có thể ngăn ngừa bằng một hoặc nhiều kháng thể bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, viêm khớp (viêm khớp dạng thấp như viêm khớp cấp, viêm khớp dạng thấp mạn tính, bệnh gút hoặc viêm khớp thống phong, viêm khớp cấp thống phong, viêm khớp miễn dịch cấp, viêm khớp mạn tính, viêm khớp thoái hóa, viêm khớp bị kích ứng bởi collagen loại II, viêm khớp nhiễm khuẩn, viêm khớp do bệnh Lyme, viêm khớp tăng sinh, bệnh viêm khớp vẩy nến, bệnh Still, viêm khớp đốt sống, và viêm khớp dạng thấp bắt đầu ở tuổi vị thành niên, bệnh viêm xương khớp, viêm khớp mạn tính (arthritis chronica progrediente), viêm khớp biến dạng, viêm đa khớp mạn tính (polyarthritis chronica primaria), viêm khớp phản ứng, và viêm đốt sống dạng thấp), bệnh da tăng sinh cao do viêm, bệnh vẩy nến như bệnh vẩy nến thể mảng, bệnh vẩy nến giọt, bệnh vẩy nến mụn mủ, và bệnh vẩy nến thuộc móng, tạng dị ứng gồm các bệnh dị ứng như bệnh sốt mùa hè và hội chứng Job, chứng viêm da gồm viêm da tiếp xúc, viêm da tiếp xúc mạn tính, viêm da tróc,

viêm da dị ứng, viêm da tiếp xúc dị ứng, viêm da dạng eczema, viêm da dạng đồng tiền, viêm tiết bã nhờn, chứng viêm da không đặc hiệu, viêm da tiếp xúc kích thích nguyên phát, và viêm da dị ứng, hội chứng IgM cao liên kết x, bệnh viêm trong mắt dị ứng, bệnh mày đay như bệnh mày đay dị ứng mạn tính và bệnh mày đay tự phát mạn tính, gồm bệnh mày đay tự miễn mạn tính, viêm cơ, bệnh viêm đa cơ/bệnh viêm bì cơ, bệnh viêm bì cơ ở tuổi vị thành niên, hoại tử thượng bì nhiễm độc, bệnh cứng bì (gồm xơ cứng toàn thân), bệnh xơ cứng như bệnh xơ cứng toàn thân, bệnh xơ cứng rải rác (multiple sclerosis: MS) như MS tủy sống-thị giác, MS tiến triển nguyên phát (primary progressive MS: PPMS), và MS thoái lui hay tái đi tái lại (relapsing remitting MS: RRMS), bệnh xơ cứng toàn thân tiến triển, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh xơ cứng động mạch, xơ cứng rải rác, bệnh xơ cứng mất điều hòa, viêm tủy sống-thần kinh thị giác (neuromyelitis optica: NMO), bệnh viêm ruột (inflammatory bowel disease: IBD) (ví dụ, bệnh Crohn, bệnh dạ dày ruột do tự miễn gây ra, viêm ruột kết như viêm ruột kết mạn loét, viêm ruột kết mạn loét (colitis ulcerosa), viêm ruột kết cục nhỏ, viêm ruột kết collagen, viêm ruột kết polyposa, viêm ruột non-kết hoại tử, và viêm ruột kết qua màng, và bệnh viêm ruột tự miễn), chứng viêm ruột, bệnh mụn da hoại thư, ban đỏ nốt, viêm đường mật gây cứng nguyên phát, hội chứng suy hô hấp, gồm hội chứng suy hô hấp ở người lớn hoặc cấp tính (ARDS), viêm màng não, chứng viêm ở tất cả hoặc một phần của màng mạch nhỏ, viêm mỏng mắt, chứng viêm màng mạch, rối loạn huyết học tự miễn, viêm đốt sống dạng thấp, viêm màng mạch dạng thấp, phù mạch di truyền, tổn hại dây thần kinh sọ như trong viêm màng não, eczema thai nghén, pemphigut thai nghén, ngứa bìu, suy buồng trứng sớm tự miễn, mất thính giác đột ngột do tình trạng bệnh tự miễn, các bệnh được điều tiết bởi IgE như phản vệ và dị ứng và viêm mũi dị ứng, viêm não như viêm não Rasmussen và viêm não rìa và/hoặc thân não, viêm màng mạch nhỏ, như viêm màng mạch nhỏ trước, viêm màng mạch nhỏ trước cấp tính, viêm màng mạch nhỏ u hạt, viêm màng mạch nhỏ không u hạt, viêm màng mạch nhỏ kháng nguyên thể thủy tinh, viêm màng mạch nhỏ sau, hoặc viêm màng mạch nhỏ tự miễn, viêm thận tiểu cầu (GN) có và không có hội chứng hư thận như viêm thận tiểu cầu mạn tính hoặc cấp tính như GN nguyên phát, GN được điều tiết bởi miễn dịch, GN thuộc màng (bệnh thận thuộc màng), GN thuộc màng tự phát hoặc bệnh thận thuộc màng tự phát, GN tăng sinh màng hoặc thuộc màng (MPGN), gồm

loại I và loại II, và GN tiến triển nhanh chóng, chứng viêm thận tăng sinh, suy nội tiết đa tuyến tự miễn, viêm quy đầu gồm viêm quy đầu balanitis circumscripta plasmacellularis, viêm quy đầu-bao, ban đỏ vòng ly tâm, ban đỏ dyschromicum dai dẳng, ban đỏ đa dạng, u hạt hình vòng, liken lấm tấm, liken xơ cứng teo, liken đơn mạn tính, liken gai, liken phẳng, bệnh vảy cá phiến mỏng, chứng tăng sinh bong biểu bì, chứng dày sừng trước ác tính, bệnh mụn da hoại thư, tình trạng bệnh dị ứng và các đáp ứng dị ứng, phản ứng dị ứng, eczema gồm eczema dị ứng hoặc eczema lạc chỗ dị ứng, eczema không tiết nhờn, eczema bệnh tổ đĩa, và vesicular palmoplantar eczema, bệnh hen như bệnh hen tiểu phế quản, bệnh hen phế quản, và bệnh hen tự miễn, tình trạng bệnh có liên quan đến sự thâm nhiễm của tế bào T và các đáp ứng viêm mạn tính, phản ứng miễn dịch kháng kháng nguyên lạ như nhóm máu A-B-O của thai nhi trong quá trình thai nghén, bệnh viêm phổi mạn tính, viêm cơ tim tự miễn, thiếu sự bám dính của bạch cầu, luput, gồm viêm thận luput, viêm não luput, luput thuộc nhi khoa, luput không thuộc thận, luput ngoài thận, luput hình đĩa và luput ban đỏ hình đĩa, luput rụng tóc lông, luput ban đỏ toàn thân (SLE) như SLE thuộc da hoặc SLE thuộc da bán cấp, hội chứng luput sơ sinh (NLE), và luput ban đỏ rải rác, bệnh đái tháo đường bắt đầu ở tuổi vị thành niên (týp I), gồm bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin ở nhi khoa (IDDM), bệnh đái tháo đường bắt đầu ở người trưởng thành (Bệnh đái đường týp II), bệnh đái tháo đường tự miễn, bệnh đái tháo nhạt tự phát, bệnh vồng mạc đái tháo đường, bệnh thận đái tháo đường, rối loạn động mạch lớn đái tháo đường, đáp ứng miễn dịch có liên quan đến tính quá mẫn cấp và trễ được điều tiết bởi xytokin và các tế bào lympho T, bệnh lao, bệnh saccit, bệnh u hạt gồm u bệnh u hạt dạng u bạch huyết, bệnh u hạt Wegener, chứng mất bạch cầu hạt, chứng viêm mạch, gồm viêm mạch, viêm mạch mạch lớn (gồm bệnh thấp khớp đau nhiều cơ và chứng viêm động mạch tế bào khổng lồ (Takayasu's)), viêm mạch mạch trung bình (gồm bệnh Kawasaki và viêm đa động mạch hình nút/viêm nút quanh động mạch), viêm đa động mạch cực nhỏ, viêm mạch miễn dịch, viêm mạch CNS, viêm mạch thuộc da, viêm mạch quá mẫn, viêm mạch hoại tử như viêm mạch hoại tử toàn thân, và viêm mạch có liên quan đến ANCA, như viêm mạch hoặc hội chứng Churg-Strauss (CSS) và viêm mạch mạch nhỏ có liên quan đến ANCA, chứng viêm động mạch thái dương, chứng thiếu máu không tái tạo, chứng thiếu máu không tái tạo tự miễn, chứng thiếu máu Coombs

dương tính, chứng thiếu máu Diamond Blackfan, chứng thiếu máu tan huyết hoặc chứng thiếu máu tan huyết miễn dịch gồm chứng thiếu máu tan huyết tự miễn (AIHA), chứng thiếu máu ác tính (anemia perniciosa), bệnh Addison's, thiếu máu không tái tạo bầm sinh hoặc bất sản (PRCA), chứng thiếu hụt yếu tố VIII, bệnh ưa chảy máu A, giảm bạch cầu trung tính tự miễn, giảm toàn thể huyết cầu, giảm bạch cầu, bệnh có liên quan đến sự xuyên mạch của bạch cầu, rối loạn viêm CNS, bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, hội chứng tổn thương đa cơ quan như các tổn thương thứ phát đến nhiễm khuẩn huyết, chấn thương hoặc xuất huyết, bệnh được điều tiết bởi phức hợp kháng nguyên-kháng thể, bệnh màng nền kháng tiểu cầu, hội chứng kháng thể kháng phospholipit, viêm dây thần kinh dị ứng, bệnh/hội chứng Behcet's, hội chứng Castleman's, hội chứng Goodpasture's, hội chứng Reynaud's, hội chứng Sjogren's, hội chứng Stevens-Johnson, dạng pemphigut như dạng pemphigut có bọt nước và dạng pemphigut ở da, pemphigut (gồm pemphigut thông thường, pemphigut tróc, dạng pemphigut màng nhầy pemphigut, và pemphigut ban đỏ), bệnh đa tuyến nội tiết tự miễn, bệnh hoặc hội chứng Reiter's, tổn thương do nhiệt, tiền sản giật, rối loạn phức hợp miễn dịch như viêm thận phức hợp miễn dịch, viêm thận được điều tiết bởi kháng thể, bệnh đa thần kinh, bệnh thần kinh mạn tính như bệnh đa thần kinh IgM hoặc bệnh thần kinh được điều tiết bởi IgM, giảm lượng tiểu cầu (như được phát triển bởi bệnh nhân bị nhồi máu cơ tim, chẳng hạn), gồm ban xuất huyết nghẽn mạch (TTP), ban xuất huyết sau khi truyền máu (PTP), giảm lượng tiểu cầu bị kích ứng bởi heparin, và giảm lượng tiểu cầu tự miễn hoặc được điều tiết bởi miễn dịch như ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát (ITP) gồm ITP mạn tính hoặc cấp tính, viêm củng mạc như tự phát viêm củng mạc sừng, viêm thượng củng mạc, bệnh tự miễn thuộc tinh hoàn và buồng trứng gồm viêm tinh hoàn và viêm buồng trứng tự miễn, chứng giảm năng tuyến giáp nguyên phát, chứng giảm năng tuyến cận giáp, các bệnh nội tiết tự miễn gồm viêm tuyến giáp như viêm tuyến giáp tự miễn, bệnh Hashimoto, viêm tuyến giáp mạn tính (viêm tuyến giáp Hashimoto's), hoặc viêm tuyến giáp bán cấp, bệnh tuyến giáp tự miễn, chứng giảm năng tuyến giáp tự phát, bệnh Grave's, hội chứng đa tuyến như hội chứng đa tuyến tự miễn (hoặc hội chứng bệnh nội tiết đa tuyến), hội chứng cận ung thư, gồm hội chứng cận ung thư thần kinh như hội chứng nhược cơ Lambert-Eaton hoặc hội chứng Eaton-Lambert, hội chứng người cứng đơ (stiff-man hoặc stiff-person), bệnh

viêm não tủy như bệnh viêm não tủy dị ứng hoặc bệnh viêm não tủy dạng dị ứng và bệnh viêm não tủy dị ứng thực nghiệm (EAE), bệnh nhược cơ năng như bệnh nhược cơ năng có liên quan đến u tuyến ức, thoái hóa tiểu não, chứng tăng trương lực cơ thần kinh, hội chứng lác rung giật mắt hoặc hội chứng giật rung cơ lác rung giật mắt (OMS), và bệnh thần kinh thuộc trung tâm cảm giác, bệnh thần kinh vận động nhiều tiêu điểm, hội chứng Sheehan's, bệnh viêm gan tự miễn, bệnh viêm gan mạn tính, bệnh viêm gan lupoid, bệnh viêm gan tế bào khổng lồ, bệnh viêm gan mạn hoạt động hoặc bệnh viêm gan mạn hoạt động tự miễn, chứng viêm phổi khu trú kể dạng bạch huyết (LIP), viêm tiểu phế quản tắc nghẽn (không cây ghép) vs NSIP, hội chứng Guillain-Barre, bệnh Berger's (bệnh thận IgA), bệnh thận IgA tự phát, bệnh da IgA thành dải, sốt cấp tính do bệnh da ưa bạch cầu trung tính, bệnh mụn mủ dưới lớp sừng, bệnh da có bong nước thoáng qua, xơ gan như xơ gan mật nguyên phát và bệnh xơ phổi, hội chứng bệnh ruột non tự miễn, bệnh Celiac hoặc Coeliac, bệnh viêm ruột loét miệng celiac (bệnh ruột non không dung nạp gluten), bệnh viêm ruột loét miệng dai dẳng, bệnh viêm ruột loét miệng tự phát, crioglobulin-huyết, xơ cứng cột bên teo cơ (ALS; bệnh Lou Gehrig's), bệnh động mạch vành, bệnh tai tự miễn như bệnh tai trong tự miễn (AIED), mất thính giác tự miễn, viêm đa sụn như viêm đa sụn dai dẳng hoặc tái phát hoặc đang tái phát, bệnh tích protein phế nang, hội chứng Cogan's /viêm giác mạc kẽ không phải dạng bệnh giang mai, chứng liệt Bell's, bệnh/hội chứng Sweet's, bệnh trứng cá đỏ tự miễn, chứng đau có liên quan đến ecpet, chứng thoái hóa dạng tinh bột, bệnh tăng bạch huyết bào không phải ung thư, bệnh tăng bạch huyết bào nguyên phát, gồm bệnh tăng bạch huyết bào tế bào B đơn dòng (ví dụ, bệnh gamma đơn dòng lạnh tính và bệnh gamma đơn dòng mức ý nghĩa không xác định, MGUS), bệnh thần kinh ngoại vi, hội chứng cận ung thư, bệnh lý kênh ion như chứng động kinh, bệnh nhức nửa đầu, chứng loạn nhịp tim, rối loạn cơ, tật điếc, đui mù, bệnh liệt chu kỳ, và bệnh lý kênh ion của CNS, chứng tự kỷ, bệnh cơ do viêm, xơ cứng tiểu cầu thận ổ hoặc mảnh hoặc ổ-mảnh (FSGS), bệnh lý mắt nội tiết, viêm màng giữa và đáy mắt, viêm màng mạch-võng mạc, rối loạn gan tự miễn, hội chứng đau cơ xơ, suy nhiều tuyến nội tiết, hội chứng Schmidt's, viêm tuyến thượng thận, teo dạ dày, sa sút trí tuệ trước tuổi già, bệnh hủy myelin như bệnh hủy myelin tự miễn và bệnh đa thần kinh hủy myelin viêm mạn tính, hội chứng Dressler's, bệnh rụng tóc vùng lớn, bệnh rụng tóc toàn bộ, hội chứng

CREST (chứng ngấm vôi, hiện tượng Raynaud's, loạn vận động thực quản, chứng xơ cứng ngón tay, và sự giãn mao mạch), chứng vô sinh tự miễn ở nam giới và nữ giới, ví dụ, do các kháng thể kháng tinh trùng, bệnh mô liên kết hỗn hợp, bệnh Chagas', sốt thấp khớp, sự sảy thai tái diễn, bệnh phổi ở người nông dân, ban đỏ đa dạng, hội chứng sau thủ thuật mổ tim, hội chứng Cushing's, bệnh phổi ở người thích nuôi chim, viêm mạch u hạt dị ứng, viêm mạch lymphô bào lạnh tính, hội chứng Alport's, chứng viêm phế nang như chứng viêm phế nang dị ứng và chứng viêm phế nang xo, bệnh phổi kẽ, phản ứng truyền máu, bệnh hủi, bệnh sốt rét, bệnh do ký sinh trùng như bệnh Leishmania, bệnh kyanosomiasis, bệnh sán máng, bệnh giun đũa, bệnh nấm Aspergillus, hội chứng Sampter's, hội chứng Caplan's, sốt xuất huyết, viêm màng trong tim, xơ hóa màng trong tim, xơ hóa phổi kẽ khuếch tán, xơ hóa phổi kẽ, xơ hóa phổi, xơ hóa phổi tự phát, bệnh xơ nang, viêm nội nhãn, ban đỏ nổi cục rắn, chứng nguyên hồng cầu huyết trẻ sơ sinh, viêm mạc ưa eosin, hội chứng Shulman's, hội chứng Felty's, bệnh giun chỉ, viêm thể mi như viêm thể mi mạn tính, viêm thể mi tập sắc, Viêm móng mắt-thể mi (cấp hoặc mạn tính), hoặc viêm thể mi Fuch's, ban xuất huyết Henoch-Schonlein, bệnh nhiễm khuẩn do virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV), SCID, hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (AIDS), bệnh nhiễm khuẩn do virus echo, bệnh nhiễm trùng, nhiễm nội độc tố huyết, viêm tụy, nhiễm độc giáp, bệnh nhiễm khuẩn do parvovirus, bệnh nhiễm khuẩn do virus rubella, hội chứng sau khi chủng ngừa vaccine, bệnh nhiễm khuẩn do rubella bẩm sinh, bệnh nhiễm khuẩn do virus Epstein-Barr, bệnh quai bị, hội chứng Evan's, suy tuyến sinh dục tự miễn, chứng mùa giạt Sydenham, chứng viêm thận sau nhiễm khuẩn cầu chuỗi, viêm mạch tạo huyết khối nghẽn, chứng nhiễm độc do tuyến giáp, tabét, viêm màng mạch, chứng đau nhiều cơ tế bào khổng lồ, viêm phổi quá mẫn mạn tính, viêm giác-kết mạc khô, viêm giác-kết mạc khô thành dịch, hội chứng bệnh viêm thận tự phát, bệnh cầu thận sang thương tối thiểu, tổn thương tái đẩy máu do thiếu máu cục bộ và thuộc gia đình, lạnh tính, tái đẩy máu cơ quan cấy ghép, tính tự miễn dịch thuộc vớng mạc, viêm khớp, chứng viêm phế quản, bệnh phổi/đường khí tắc nghẽn mạn tính, bệnh bụi phổi, bệnh áp tở, viêm miệng áp tở, rối loạn xơ cứng động mạch, bệnh asperniogenese, sự tan huyết tự miễn, bệnh Boeck's, crioglobulin-huyết, sự co cứng Dupuytren's, viêm nội nhãn phản vệ thể thủy tinh, viêm ruột non dị ứng, ban đỏ nốt do cùi, chứng liệt mặt tự phát, hội chứng

mệt mỏi mạn tính, sốt thấp khớp, bệnh Hamman-Rich's, mất thính giác thần kinh cảm giác, huyết cầu tố-niêu kịch phát, bệnh giảm năng tuyến sinh dục, viêm ruột hồi đoạn cuối, giảm bạch cầu, bệnh tăng bạch cầu đơn nhân nhiễm khuẩn, viêm tủy ngang, chứng phù niêm tự phát nguyên phát, bệnh hư thận, nhân viêm đồng cảm, viêm tinh hoàn u hạt, viêm tụy, viêm nhiều rễ thần kinh cấp, bệnh mụn da hoại thư, viêm tuyến giáp Quervain's, chứng teo spenic mắc phải, u tuyến ức không phải ác tính, bệnh bạch biến, hội chứng sốc độc tố, ngộ độc thức ăn, tình trạng bệnh có liên quan đến sự thâm nhiễm của tế bào T, chứng thiếu hụt sự bám dính của bạch cầu, đáp ứng miễn dịch có liên quan đến tính quá mẫn cấp và trễ được điều tiết bởi xytokin và các tế bào lympho T, các bệnh có liên quan đến sự xuyên mạch của bạch cầu, hội chứng tổn thương đa cơ quan, bệnh được điều tiết bởi phức hợp kháng nguyên-kháng thể, bệnh màng nền kháng tiểu cầu, viêm dây thần kinh dị ứng, bệnh đa tuyến nội tiết tự miễn, viêm buồng trứng, chứng phù niêm nguyên phát, viêm dạ dày teo tự miễn, viêm mắt đồng cảm, bệnh thấp khớp, bệnh mô liên kết hỗn hợp, hội chứng hư thận, viêm đảo tụy, suy đa tuyến nội tiết, hội chứng đa tuyến tự miễn loại I, chứng giảm năng tuyến cận giáp tự phát bắt đầu ở người trưởng thành (AOIH), bệnh cơ tim như bệnh cơ tim bị giãn, bong biểu bì bong nước mắc phải (EBA), bệnh nhiễm sắc tố sắt mô, viêm cơ tim, hội chứng hư thận, viêm đường mật gây cứng nguyên phát, viêm xoang mũi hoặc không mũi, viêm xoang cấp hoặc mạn tính, viêm xoang xương sàng, trán, xương hàm trên, hoặc xương bướm, rối loạn có liên quan đến bạch cầu ưa eosin như chứng tăng bạch cầu ưa eosin, chứng tăng bạch cầu ưa eosin thâm nhiễm phổi, hội chứng tăng bạch cầu ưa eosin-đau cơ, hội chứng Löffler's, viêm phổi ưa eosin mạn tính, chứng tăng bạch cầu ưa eosin phổi nhiệt đới, bệnh nấm Aspergillus viêm phế quản-phổi, u nấm do Aspergillus, hoặc u hạt chứa các tế bào ưa eosin, phản vệ, viêm khớp đốt sống huyết thanh âm tính, bệnh tự miễn đa tuyến nội tiết, viêm đường mật gây cứng, củng mạc, thượng củng mạc, bệnh nấm Candida niêm mạc da mạn tính, hội chứng Bruton's, chứng giảm gamma globulin-huyết thời kỳ vị thành niên, hội chứng Wiskott-Aldrich, hội chứng mất điều hòa giãn mạch, giãn mạch, rối loạn tự miễn có liên quan đến bệnh collagen, bệnh thấp, bệnh thần kinh, viêm hạch bạch huyết, giảm đáp ứng huyết áp, loạn chức năng mạch, tổn thương mô, chứng thiếu máu cục bộ tim-mạch, chứng tăng cảm đau, chứng thiếu máu cục bộ thận, chứng thiếu máu cục bộ

não, và bệnh đi kèm với sự tạo mạch, rối loạn quá mẫn dị ứng, viêm thận tiểu cầu, tổn thương tái tưới máu, thiếu máu cục bộ re-sự truyền dịch rối loạn, tổn thương tái tưới máu của cơ tim hoặc các mô khác, viêm khí-phế quản thuộc u bạch huyết, bệnh da do viêm, bệnh da với các thành phần viêm cấp, suy đa cơ quan, bệnh có bong nước, hoại tử vỏ thận, viêm màng não mủ cấp hoặc các rối loạn viêm hệ thần kinh trung ương khác, rối loạn viêm mắt và ổ mắt, hội chứng có liên quan đến việc truyền bạch cầu hạt, tính độc gây ra bởi xytokin, chứng ngủ rũ, chứng viêm nghiêm trọng cấp tính, chứng viêm khó chữa mạn tính, viêm bề thận, chứng tăng sản nội động mạch, loét dạ dày, chứng viêm âm hộ, và bệnh lạc nội mạc tử cung.

Các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có thể có nhiều ứng dụng trong lý thuyết, y học và thương mại. Các kháng thể này có thể được sử dụng trong các loại thử nghiệm chẩn đoán khác nhau, ví dụ, để phát hiện nhiều bệnh hoặc sự có mặt của các thuốc (dược phẩm), độc tố hoặc các protein khác bao gồm hormon, *in vitro* hoặc *in vivo*. Các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có thể có thể được sử dụng trong việc thử nghiệm bệnh, ví dụ, trong huyết thanh hoặc máu của bệnh nhân. Bệnh này có thể gồm Bệnh hoặc các bệnh liên quan đến OX40 hoặc hướng dẫn sử dụng thuốc không có liên quan đến OX40 gồm các bệnh ung thư, bệnh viêm hoặc bệnh tự miễn khác nhau. Các kháng thể cũng có thể được sử dụng trong việc phát hiện miễn dịch phóng xạ và trị liệu miễn dịch phóng xạ của bệnh ung thư, và một số phương pháp thử nghiệm mới có thể sử dụng các kháng thể được mô tả này cho đích là màng tế bào của các loại tế bào cụ thể, tức là, tế bào ung thư.

Các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có thể được tạo ra là một phần của kit hoặc gói chẩn đoán khác. Như vậy, được đề xuất trong bản mô tả này là kit chẩn đoán, hoặc sản phẩm để sử dụng với phương pháp xử lý sơ bộ ở đây. Kit chẩn đoán có thể gồm một hoặc nhiều nguyên liệu bất kỳ sau đây: nguyên liệu tham chiếu chất đối kháng/kháng thể/thuốc; kháng thể trung hoà đối chứng dương (tốt hơn nếu là dê của khỉ cyno); cột Protein A+G (ví dụ cột Protein A/G); chất phản ứng khử lipid; chất đệm tinh chế ái lực globulin miễn dịch (ví dụ chất đệm liên kết, rửa giải và trung hoà); huyết thanh bổ sung; chất pha loãng thử nghiệm cho tế bào; hướng dẫn bằng tay hoặc văn bản; lọ nhỏ của tế bào được làm đông lạnh (ví dụ, tế bào WIL2); chất gắn nhãn tế bào (như “ TITER GLO.RTM.”), v.v. ví dụ như, kit

chẩn đoán có thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: (a) chất khử lipit; (b) chất đệm (ví dụ chất đệm liên kết và rửa giải) để tinh chế ái lực globulin miễn dịch; và (c) hướng dẫn bằng tay để hướng dẫn người sử dụng kit chẩn đoán sử dụng kit để xử lý trước mẫu sinh học từ đối tượng mắc bệnh tự miễn hoặc ung thư trước khi thực hiện thử nghiệm sinh học trên cơ sở tế bào (như thử nghiệm kháng thể trung hoà) trên mẫu (ví dụ để tránh vấn đề gây cản trở của huyết thanh). Kit chẩn đoán còn tùy ý bao gồm một hoặc nhiều chất bất kỳ sau: nguyên liệu thuốc chuẩn, kháng thể trung hoà đối chứng dương, huyết thanh bổ sung, chất pha loãng thử nghiệm cho tế bào, và chất gắn nhãn tế bào, v.v.

Các kháng thể và các phát hiện khác được mô tả trong bản mô tả này còn mang lại các phương pháp sàng lọc hiệu suất cao. Cụ thể hơn, và như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng, phương pháp năng suất cao để sàng lọc kháng thể đơn dòng đối kháng hoặc chủ vận hoặc phân tử nhỏ mà liên kết với thụ thể OX40, và có thể ức chế sự tạo thành và chức năng của các tế bào Tr1 hoặc thúc đẩy sự tạo thành và chức năng của các tế bào Tr1, có thể được tạo ra. Theo một phương pháp, dòng tế bào T ở người (SU-DHL-1) có khả năng sản xuất IL-10 được chuyển nhiễm với gen OX40 ở người (SUOX40). 100.000 SUOX40 tế bào được nuôi cấy với hoặc 100.000 tế bào nguyên bào sợi chuột nhắt (Tế bào L) hoặc 100.000 tế bào nguyên bào sợi chuột nhắt biểu hiện phối tử OX40 ở người (tế bào L phối tử OX40) trong đĩa có 96 giếng. Sau 48 giờ nuôi cấy, phần dịch nổi môi trường nuôi cấy được thu gom để đo IL-10 bằng ELISA đặc hiệu IL-10. Trong thử nghiệm đại diện, 100.000 tế bào SUOX40 sản xuất lên tới 6.000 pg/ml IL-10 được nuôi cấy trong sự vắng mặt của phối tử OX40. Trong điều kiện có mặt phối tử OX40, 100.000 tế bào SUOX40 sản xuất ít hơn 1.000 pg/ml IL-10. Phương pháp nuôi cấy có thể được sử dụng để sàng lọc, không kể những cái khác, kháng thể đơn dòng đối kháng hoặc phân tử nhỏ mà phong bế khả năng của phối tử OX40 để ức chế sự sản xuất IL-10 bằng tế bào SUOX40. Theo cách khác, phương pháp nuôi cấy có thể được cải biến bằng cách thay thế tế bào L biểu hiện phối tử OX40 bằng kháng thể đơn dòng chủ vận tiềm năng hoặc phân tử nhỏ đặc hiệu với OX40 để xác định, không kể những cái khác, khả năng của chúng để ức chế sự sản xuất IL-10 bởi tế bào SUOX40.

Kháng thể kháng OX40 được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng làm thử nghiệm hoặc trong thử nghiệm để kiểm tra hoặc xác định hoạt tính của thuốc hoặc phân tử khác được tìm thấy ở sinh vật hoặc mẫu hữu cơ. Chúng có thể còn được sử dụng trong thử nghiệm định lượng để đo hàm lượng của chất trong mẫu. Thử nghiệm sinh học và thử nghiệm miễn dịch là một trong số nhiều thử nghiệm hóa sinh đặc hiệu mà các kháng thể này có thể được sử dụng. Các kháng thể kháng OX40 được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong thử nghiệm khác để đo các quy trình như hoạt tính enzym, sự bắt giữ kháng nguyên, hoạt tính tế bào gốc, và liên kết protein cạnh tranh.

Các tế bào L biểu hiện GITRL, OX40L, 4-1BBL, ICOSL ở người được tạo ra bởi sự truyền tính trạng được điều tiết bởi retrovirus, như người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng đã biết. Một cách ngắn gọn, trình tự mã hoá nguyên chiều dài đối với GITRL ở người (Accession# NM_005092), OX40L (Accession# NM_003326), 4-1BBL (Accession# NM_003811), ICOSL (Accession# NM_015259) được khuếch đại bởi RT-PCR với ARN được điều chế từ PBMC được kích thích bởi HSV-1. Sau đó, cADN được tách dòng vào vector retrovirus gốc MSCV pMIGW2 và plasmit thu được được xác minh bằng enzym cắt giới hạn và bằng cách xác định trình tự ADN. Để sản xuất retrovirus tái tổ hợp, mỗi vector được đồng chuyển nhiễm với các cấu trúc bao gói pCL-gp (gag/pol) và pHCMV-VSVg (vỏ glycoprotein VSV) trong tế bào HEK293T. Hai ngày sau, virus chứa phần dịch nổi môi trường nuôi cấy được thu hoạch và được sử dụng để gây nhiễm các tế bào L CD32 ở moi 100. Trong điều kiện này >95% tế bào được biến nạp sinh sản.

Bạch cầu đơn nhân CD14⁺ được phân lập (độ tinh khiết >94%) được nuôi cấy trong điều kiện có mặt 100 ng/ml GM-CSF và 50 ng/ml IL-4 (cả hai chất này của hãng R&D) trong 5 ngày, như người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng đã biết. DC chưa trưởng thành thu được được rửa và được nuôi cấy trong 24 giờ với IFN- α (1000U/ml, PBL Biomedical Laboratories), IL-10 (10 ng/ml, R&D), và các tế bào L được chuyển nhiễm CD40L được chiếu xạ (tỷ lệ tế bào DC so với L, 4:1) để thu được DC trưởng thành, như người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng đã biết.

Tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm và tế bào T CD4⁺ ghi nhớ (mỗi loại tế bào có độ tinh khiết >99%) được phân lập từ PBMC sử dụng Kit Phân lập tế bào T CD4⁺ II (Miltenyi Biotec) sau đó là chọn lọc tế bào (phân đoạn CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻CD25⁻ là tế bào T chưa qua thí nghiệm và phân đoạn CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺CD25⁻ là tế bào T ghi nhớ), như người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng đã biết. 4x10⁴ tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm khác loài mới được tinh chế được đồng nuôi cấy với DC chưa trưởng thành hoặc được nuôi cấy (Tỷ lệ DC với T, 1:10) trong sự có mặt hoặc vắng mặt của OX40L ở người tái tổ hợp (R&D, 100 ng/ml) trong các đĩa 96 giếng đáy tròn trong 7 ngày, như người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng đã biết. Tế bào T CD4⁺ được tinh chế cũng được nuôi cấy với IL-12 (10 ng/ml, R&D), IL-4 (25 ng/ml, R&D), hoặc hỗn hợp của dexamethason (5x10⁻⁸ M, Life Technologies) và 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (10⁻⁷ M) trong 7 ngày trong điều kiện có mặt kháng thể đơn dòng kháng CD28 hòa tan (CD28,2, 1 µg/ml) và IL-2 (50 U/ml, R&D) trên tế bào CD32/ OX40L-L được chiếu xạ, tế bào CD32/GITRL-L, tế bào CD32/4-1BBL- L, hoặc tế bào CD32-L bố mẹ mà đã được phủ trước bằng kháng thể đơn dòng kháng CD3 (OKT3, 0,2 µg/ml) trong đĩa 48 giếng (Tỷ lệ tế bào T so với tế bào L, 2,5:1), như người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng đã biết. Theo một số thử nghiệm, tế bào T CD4⁺ được nuôi cấy trong 7 ngày trên tế bào CD32-L, hỗn hợp của tế bào CD32-L và Tế bào CD32/ICOSL-L (tỷ lệ 1:1), hoặc hỗn hợp của tế bào CD32/ICOSL-L và tế bào CD32/OX40L-L (tỷ lệ 1:1) được phủ trước bằng kháng thể đơn dòng kháng CD3 (0,2 µg/ml) trong đĩa 48 giếng, như người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng đã biết. RPMI 1640 được sử dụng và được bổ sung 10% FCS, 2 mM L-glutamin, 1 mM natri pyruvat, penicxlin G, và streptomycin cho môi trường nuôi cấy, như người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng đã biết.

Tế bào T được nuôi cấy được thu gom và rửa, và sau đó được kích thích lại bằng kháng CD3 liên kết đĩa (5 µg/ml) và kháng CD28 hòa tan (2 µg/ml) ở hàm lượng 1x10⁶ tế bào/ml trong 24 giờ, như người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng đã biết. Hàm lượng của IL-4, IL-10, TNF-α, và IFN-α trong phần dịch nổi được xác định bằng ELISA (tất cả bộ kit của hãng R&D), như người

có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng đã biết. Để sản xuất xytokin nội bào, tế bào T được nuôi cấy được kích thích lại bằng 50 ng/ml PMA cộng với 2 μ g/ml ionomycin trong 6 giờ. Brefeldin (10 μ g/ml) được bổ sung trong 2 giờ cuối cùng, như người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng đã biết. Các tế bào được nhuộm màu bằng hỗn hợp kháng thể đơn dòng được gắn nhãn PE với IL-4 hoặc kháng thể đơn dòng được gắn nhãn TNF- α FITC với IFN- α và kháng IL-10 được gắn nhãn APC (tất cả đều của hãng BD) bằng cách sử dụng kit FIX và PERM (CALTAG), như người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng đã biết.

Tế bào T được thu gom và được tái tạo huyền phù trong môi trường chứa EDTA để làm phân ly các cụm, như người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng đã biết. Các tế bào sống được đếm bằng loại trừ trypan-màu xanh da trời của các tế bào chết, như người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng đã biết. Để thử nghiệm chức năng kìm hãm, tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm (A) và tế bào Tr1 được tạo ra từ tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm bằng kháng thể đơn dòng kháng CD3, kháng thể đơn dòng kháng CD28, IL-2, Dex, và vit D3 trong điều kiện có mặt tế bào L bố mẹ (B) hoặc tế bào OX40L-L (C), ba loại tế bào này và hỗn hợp của chúng ở tỷ lệ 1:1 sau đó được kích thích lại trong 5 ngày bằng cách nuôi cấy trong điều kiện có mặt 5 μ g/ml kháng thể đơn dòng kháng CD3 và 1 μ g/ml kháng thể đơn dòng kháng CD28, sau thời gian này sự tăng sinh tế bào được đánh giá bằng cách kết hợp [³H]thymidin, như người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng đã biết.

Sự tạo thành kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng OX40 của người

Các tác giả sáng chế đã tạo ra kháng thể đơn dòng chuột nhất chủ vận phức hợp kháng OX40 người. Tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên của các kháng thể được xác nhận bằng bào kế chảy (các hình vẽ Fig. 10-12). Hoạt tính chủ vận của các kháng thể được đánh giá thông qua thử nghiệm chức năng. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng 9 trong số 20 kháng thể đặc hiệu OX40 có thể phong bế sự tạo thành tế bào Tr1 được điều tiết bởi vitamin D3/dexamethason từ tế bào T CD4⁺ (Fig. 13), tăng cường sự tăng sinh tế bào T CD4⁺ (Fig. 14), và ức chế sự sản xuất

ICOS⁺CD4⁺CD25^{cao}Foxp3⁺ Treg IL-10 (Fig. 16). Các tác giả sáng chế đã chuẩn độ các kháng thể và phát hiện ra rằng năm hoạt tính tiềm năng trong việc ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 ở nồng độ thấp bằng 4 ng/ml (Fig. 15).

Kháng thể OX40 ức chế chức năng CD4⁺CD25^{cao}Foxp3⁺ Treg

Một số kháng thể đơn dòng OX40 ức chế chức năng kìm hãm của Foxp3⁺ Treg (Fig. 17). Trong số năm kháng thể (119-8B, 119-43, 119-122, 119-173B, và 106-222) có tiềm năng ức chế sự sản xuất IL-10 từ các tế bào Tr1 và CD4⁺CD25^{cao}CD127-Foxp3⁺ Tregs, ba kháng thể (119-43, 119-122, và 106-222) có tiềm năng trong việc phong bế chức năng CD4⁺CD25^{cao}CD127-Foxp3⁺ Treg (Fig. 17). Tuy nhiên, hai kháng thể (119-33 và 120-140A) trong số 11 kháng thể không có hoạt tính kháng sự sản xuất IL-10, nhưng phong bế chức năng CD4⁺CD25^{cao}Foxp3⁺ Treg (Fig. 18).

Kháng thể đơn dòng OX40 kháng người

Sự tạo thành kháng thể đơn dòng OX40 kháng người được thực hiện, ví dụ, bằng cách gây miễn dịch chuột nhắt BALB/c 6–8 tuần tuổi bằng dòng tế bào chuột nhắt được chuyển nhiễm với OX40 ở người sau khi thực hiện quy trình. Dòng lai tiết ra kháng thể đơn dòng mà các tế bào OX40⁺ được nhuộm màu đặc hiệu được thiết lập và được phân tích.

Các tác giả sáng chế thiết kế việc sàng lọc toàn bộ để phát hiện các dòng hoạt hóa việc truyền tín hiệu OX40 (tức là, các kháng thể chủ vận) bằng cách ức chế sự tạo thành và chức năng của các tế bào Tr1. Các dòng này được tinh chế tiếp. Các kháng thể chủ vận kháng hOX40 có thể được làm giống người và sử dụng trong quy trình lâm sàng để trị liệu kháng khối u ở người, ở dạng riêng lẻ hoặc ở dạng hỗn hợp với vacxin kháng khối u và tá được khác. Một vài loại khối u khác nhau có thể là đích của các kháng thể gồm, gồm u melanin, u lympho và ung thư vú.

Theo phương án khác, chuột nhắt cái BALB/c 6-8 tuần tuổi được sử dụng cho chân hoặc gây miễn dịch dưới da. Mỗi con chuột nhắt được tiêm 5 triệu tế bào L ở chuột được chuyển nhiễm với OX40 ở người (L-OX40) 6 lần ở các khoảng thời gian 3 ngày. Ba ngày sau khi tiêm lần thứ sáu, chuột nhắt bị giết và u lympho vùng

kheo (từ sự gây miễn dịch chân) hoặc lá lách (từ sự gây miễn dịch vết cắt) được loại bỏ và các tế bào được dung hợp với các tế bào u tủy SP2.0 hoặc u tủy NSO ở tỷ lệ 1:1 để tạo ra dòng lai bằng cách sử dụng quy trình được thiết lập. Dòng lai tiết ra kháng thể đơn dòng sau đó được sàng lọc về tính đặc hiệu liên kết của chúng với tế bào L-hOX40 bằng thử nghiệm ELISA. Phần dịch nổi bề mặt thể lai mà liên kết với tế bào L-hOX40 và không liên kết với các tế bào bố mẹ L được xác nhận tiếp về việc liên kết trên các tế bào L-hOX40 và SUPM2-hOX40 bằng phân tích bào kế chảy.

Trong thử nghiệm trên Fig. 10, phần dịch nổi bề mặt thể lai hOX40 được sàng lọc đối với L-hOX40 so với các tế bào bố mẹ L bằng ELISA. Hai mươi kháng thể đơn dòng đặc hiệu hOX40 được chọn. Hai mươi triệu tế bào L hoặc tế bào L biểu hiện OX40 ở người (L-hOX40) được phủ trên đĩa 96 giếng bằng cách trộn tế bào với 0,01% magie canxi clorua trong PBS và để khô qua đêm trong nắp lam kính. Sau đó, các đĩa được làm đông lạnh ở -20°C trong ít nhất một ngày trước khi sử dụng. Đối với thử nghiệm liên kết kháng thể, các tế bào được làm đông lạnh được tái hydrat hóa với PBS và rửa bằng chất đệm rửa chứa PBS cộng với 0,05% Tween 20, và phong bế bằng 2% BSA trong chất đệm rửa. Sau đó, các tế bào quy định được sử dụng để liên kết với phần dịch nổi bề mặt kháng thể OX40. Sau đó, kháng thể liên kết với tế bào được phát hiện bằng kháng thể thứ cấp, IgG FC HRP kháng chuột nhất. Phần dịch nổi bề mặt thể lai đặc hiệu hOX40 nhận diện tế bào L biểu hiện OX40 nhưng không nhận diện tế bào L bố mẹ.

Trong thử nghiệm trên Fig. 11, kháng thể đơn dòng đặc hiệu hOX40 được sàng lọc bằng phân tích bào kế chảy. Số lượng bằng nhau (100k) của tế bào L và tế bào L-hOX40 được trộn trong chất đệm FACS (1% FCS/2mM EDTA/PBS) và được ủ với 0,5 μg các kháng thể được tinh chế FPLC (chất đệm rửa giải Protein A HiTrap/Gentle Ag/Ab). Sau đó, tế bào được rửa và được nhuộm màu bằng kháng thể thứ cấp, IgG kháng chuột nhất kết hợp PE. Hai đỉnh là sự nhuộm màu dương tính và âm tính bằng kháng thể đơn dòng kháng hOX40. Một đỉnh riêng lẻ chỉ các kháng thể không liên kết hoặc liên kết không đặc hiệu. Hai mươi kháng thể đơn dòng đặc hiệu hOX40 được xác nhận bằng phân tích bào kế chảy.

Trong thử nghiệm trên Fig. 12, tính đặc hiệu kháng thể đơn dòng hOX40 được xác nhận bằng cách sử dụng các tế bào SUPM2 biểu hiện hOX40 (SUPM2-hOX40). Số lượng bằng nhau (100k) của các tế bào SUPM2 và SUPM2-hOX40 được trộn trong chất đệm FACS (1%FCS/2mM EDTA/PBS) và được sử dụng để liên kết kháng thể đơn dòng hOX40 như trên Fig. 11. Tính đặc hiệu liên kết của mỗi kháng thể được phân tích bằng bào kế chảy. Hai đỉnh chỉ sự nhuộm màu dương tính và âm tính bởi kháng thể đơn dòng kháng hOX40, trong khi một đỉnh đơn lẻ chỉ sự không có liên kết hoặc liên kết không đặc hiệu bởi các kháng thể. Hai mươi kháng thể đơn dòng đặc hiệu hOX40 được xác nhận lại.

Trong thử nghiệm trên Fig. 13, các tác giả sáng chế cố gắng xác định kháng thể đơn dòng đặc hiệu hOX40 ở người mà có thể ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 từ tế bào T CD4⁺ được kích thích bởi VitD₃ (10 microMol mM)/Dex (50 nanoM), CD32L/ICOSL và kháng CD3/CD28 (0,2 microgam/ml). Kháng thể đơn dòng kháng hOX40 được bổ sung vào ngày 0 của dịch nuôi cấy tế bào và tế bào T CD4⁺ sau khi kích thích 7 ngày được cho nhuộm màu nội bào IL-10 sau đó là phân tích bào kế chảy. Dữ liệu sắp xếp tế bào được hoạt hóa bởi huỳnh quang điển hình (FACS) được thể hiện ở A và tỷ lệ phần trăm của tế bào Tr1 đối với tất cả các lần xử lý kháng thể đơn dòng kháng hOX40 được thể hiện trong B. Bằng cách sử dụng các tế bào thu được từ thử nghiệm này, các tác giả sáng chế cố gắng xác định kháng thể đơn dòng đặc hiệu hOX40 mà kích thích sự tăng sinh tế bào T CD4⁺ (Fig. 14, các tế bào được đếm vào ngày 7 sau khi kích thích) và ức chế sự tạo thành Tr1 từ CD4⁺ (Fig. 13).

Để xác định khả năng của kháng thể đơn dòng hOX40 để ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 từ tế bào T CD4⁺, tế bào Tr1 được tạo ra và được nuôi cấy như được mô tả trong thử nghiệm trên Fig. 13 trên đây. Dữ liệu FACS đại diện được thể hiện ở A và tỷ lệ phần trăm của các tế bào Tr1 sau khi xử lý bằng chín kháng thể đơn dòng kháng hOX40 được thể hiện trong B. Năm kháng thể đơn dòng đặc hiệu hOX40 ức chế mạnh sự tạo thành tế bào Tr1 ở nồng độ 4 ng/ml (Fig. 15).

Trong thử nghiệm trên các hình vẽ Fig. 16A, 16B, và 16C, tế bào T ICOS⁺CD4⁺CD127⁻CD25^{cao} mới được lựa chọn được kích thích bằng kháng CD3

(0,2 $\mu\text{g/ml}$) trong điều kiện có mặt tế bào CD32L/ICOSL và tế bào CD32L/hOX40L hoặc kháng thể đơn dòng kháng hOX40 hoặc kháng thể đối chứng trong 5 ngày. Sau đó, các tế bào được đếm và 5×10^4 tế bào được kích thích lại bằng kháng CD3/CD28 trong 24 giờ và phần dịch nổi được thử nghiệm về sự tiết IL-10 bằng kit ELISA. Các tác giả sáng chế đã nhận diện được kháng thể đơn dòng đặc hiệu hOX40 mà ức chế sự tạo thành Tr1 từ tế bào T CD4⁺ cũng như ức chế sự sản xuất IL-10 từ tế bào T ICOS⁺CD4⁺CD25^{cao} tự nhiên. Tregs ICOS⁺ ICOS⁻CD4⁺CD127⁻CD25^{cao} mới được lựa chọn được nuôi cấy với tế bào CFSECD4⁺CD25^{thấp} được gắn nhãn trong điều kiện có mặt bạch cầu đơn nhân được chiếu xạ và kháng CD3 (0,3 $\mu\text{g/ml}$) và mAbs kháng hOX40. Sau khi nuôi cấy 3,5 ngày, sự tăng sinh tế bào được đánh giá đối với dịch pha loãng của CFSE trong các tế bào bằng FACS (Fig. 16C).

Các hình vẽ Fig. 17A và Fig. 7B thể hiện việc nhận dạng kháng thể đơn dòng kháng hOX40 mà ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 và phong bế chức năng Treg Foxp3⁺CD4⁺CD127⁻CD25^{cao}. Tế bào T Foxp3⁺CD4⁺CD127⁻CD25^{cao} mới được lựa chọn ($3,5 \times 10^4$) được nuôi cấy với tế bào CFSECD4⁺CD25^{thấp} được gắn nhãn (7×10^4) trong điều kiện có mặt bạch cầu đơn nhân được chiếu xạ (7×10^4 , 6000 rad) và 0,3 $\mu\text{g/ml}$ kháng CD3 và các nồng độ khác nhau của kháng thể đơn dòng kháng hOX40. Sau khi nuôi cấy 3 đến 4 ngày, sự tăng sinh tế bào được đánh giá đối với dịch pha loãng của CFSE trong tế bào bằng phân tích bào kế chảy. Tỷ lệ phần trăm của các tế bào phân chia được thể hiện. Phân tích bào kế chảy đại diện được thể hiện trên Fig. 17A. Dữ liệu đối với 6 kháng thể đơn dòng được thể hiện trên Fig. 17B.

Trong thử nghiệm trên Fig. 18, tế bào T Foxp3⁺CD4⁺CD127⁻CD25^{cao} mới được lựa chọn ($3,5 \times 10^4$) được nuôi cấy với tế bào CFSECD4⁺CD25^{thấp} được gắn nhãn (7×10^4) trong điều kiện có mặt bạch cầu đơn nhân được chiếu xạ (7×10^4 , 6000 rad) và 0,3 $\mu\text{g/ml}$ kháng CD3 và các nồng độ khác nhau của kháng thể đơn dòng OX40. Sau khi nuôi cấy từ 3 đến 4 ngày, sự tăng sinh tế bào được đánh giá đối với dịch pha loãng của CFSE thuốc nhuộm trong các tế bào bằng FACS. Dữ liệu là đại diện của hai thử nghiệm. Các tác giả sáng chế đã nhận diện kháng thể đơn dòng

kháng hOX40 mà không ức chế sự tạo thành Tr1 nhưng phong bế chức năng Treg Foxp3⁺CD4⁺CD25^{cao}.

Trong thử nghiệm trên các hình vẽ Fig. 19A và Fig. 19B, tế bào T CD4⁺CD25^{cao} có nguồn gốc từ u lympho được nuôi cấy với tế bào CFSECD4⁺CD25^{thấp} được gắn nhãn (7×10^4) được phân lập từ thể cho khỏe mạnh trong điều kiện có mặt bạch cầu đơn nhân khác loại được chiếu xạ (7×10^4 , 6000 rad) và 0,3 microgam/ml kháng CD3 và 25 µg/ml kháng thể đơn dòng kháng hOX40. Sau khi nuôi cấy từ 3 đến 4 ngày, sự tăng sinh tế bào được đánh giá đối với dịch pha loãng CFSE bằng FACS. Phân tích FACS đại diện được thể hiện trên Fig. 19A và dữ liệu đối với tất cả các thử nghiệm được thể hiện trên Fig. 19B. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng kháng thể chủ vận hOX40 phong bế chức năng Treg CD4⁺CD25^{cao} có nguồn gốc từ u lympho.

Fig. 20 thể hiện sự nhận diện kháng thể chủ vận OX40 mà liên kết đặc hiệu với OX40 ở người và ở khỉ rezut. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi khỉ rezut thu được bằng cách ly tâm Ficoll. Tế bào T CD4⁺ thu được bằng vi hạt CD4. Tế bào T CD4⁺ được kích thích bằng 10 µg/ml lectin từ đậu cô ve (PHA). Hai ngày sau khi kích thích, các tế bào được nhuộm màu bằng mAbs kháng hOX40 sau đó là IgG-APC kháng chuột ở dê và CD69-PE. 106-317 được sử dụng làm đối chứng âm tính. Sáu mAbs kháng hOX40 mà hoạt hóa mạnh sự tăng sinh tế bào T có thể liên kết với tế bào T CD4⁺ Khi rezut được hoạt hóa, được thể hiện. Các kết quả này cho thấy rằng độc tính của sáu kháng thể đơn dòng kháng hOX40 này có thể được thử nghiệm ở khỉ.

Chỉ bảy trong số 500 dòng dương tính OX40 kháng người thu được bằng cách sử dụng quy trình dung hợp thông thường, thể hiện các tính chất của việc khởi động OX40, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, khả năng phong bế IL-10 trong việc gây ra sự tạo thành Tr1 và chức năng kìm hãm nTreg như nêu trong Bảng 1.

Bảng 1. Danh sách kháng thể đơn dòng đặc hiệu OX40

	Dòng kháng thể đơn dòng	Phong bế IL-10	Phong bế nTreg
--	-------------------------	----------------	----------------

	Dòng kháng thể đơn dòng	Phong bế IL-10	Phong bế nTreg
1	106-108	-	-
2	106-317	-	-
3	106-107	-	-
4	106-148	-	-
5	119-204A	-	-
6	119-220C	-	+
7	119-33A	-	+
8	119-58	-	+
9	119-181A	-	+
10	119-157A	-	+
11	120-140A	-	+
12	119-8B	+	-
13	119-173B	+	-
14	106-132	+	+
15	106-222	+	+
16	119-43	+	+
17	119-122	+	+
18	119-69A	+	+
19	120-56	+	+
20	120-270	+	+

Các dòng lai 106-222 và 119-122 được chọn dựa trên ba tiêu chuẩn

1. Chúng ức chế sự tạo thành tế bào Tr1 từ tế bào T CD4⁺ (Treg cảm ứng)
2. Chúng bảo toàn chức năng kìm hãm của các tế bào Foxp3⁺nTreg
3. Chúng thể hiện tác dụng ức chế phụ thuộc liều lượng của sự ngừng và sự đảo ngược tế bào Tr1 của chức năng Foxp3⁺Treg

Kháng thể khảm và được làm giống người

Sự người hóa (còn được gọi là tạo hình hoặc ghép CDR) là kỹ thuật đã biết để làm giảm khả năng gây miễn dịch của kháng thể đơn dòng từ các nguồn ngoại lai

(bao gồm nhưng không giới hạn ở chuột) và để cải thiện sự hoạt hóa của chúng đối với hệ miễn dịch ở người. Mặc dù cơ chế của việc tạo ra kháng thể đơn dòng được thiết kế di truyền bằng cách sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử là đã biết, việc ghép đơn giản vùng quyết định bổ thể chuột (CDR) vào khung hoạt động người không luôn tái tạo thành liên kết ái lực và tính đặc hiệu liên kết của kháng thể đơn dòng ban đầu.

Để làm giống người kháng thể, thiết kế của kháng thể được làm giống người là bước quyết định trong việc tái tạo chức năng của phân tử ban đầu. Thiết kế này bao gồm các lựa chọn khác nhau: kéo dài CDR, khung hoạt động ở người để sử dụng và việc thay thế các gốc từ kháng thể đơn dòng ở chuột vào vùng khung hoạt động ở người (đột biến ngược). Các vị trí đột biến ngược đã được xác định chủ yếu bằng phân tích trình tự/cấu trúc hoặc bằng phân tích mẫu tương đồng của cấu trúc 3D của vùng thay đổi.

Gần đây, thư viện phagor đã được sử dụng để làm thay đổi axit amin ở các vị trí được chọn. Tương tự, nhiều kết quả nghiên cứu đã được sử dụng để lựa chọn khung hoạt động ở người thích hợp nhất để ghép CDR ở chuột vào đó. Các thử nghiệm sớm sử dụng tập hợp con hạn chế của kháng thể đơn dòng ở người đã được xác định rõ đặc điểm (thường nhưng không luôn luôn khi mà cấu trúc đã có sẵn), bất kể sự tương đồng trình tự với kháng thể đơn dòng ở chuột (được gọi là sự tiếp cận khung hoạt động cố định). Một số nhóm sử dụng vùng thay đổi có với độ tương đồng trình tự axit amin cao với vùng thay đổi ở chuột (sự bắt cặp tương đồng hoặc tương hợp nhất); các nhóm khác sử dụng trình tự liên ứng hoặc trình tự dòng tế bào gốc trong khi các nhóm khác nữa lựa chọn các mảnh của trình tự khung hoạt động trong vòng mỗi vùng thay đổi chuỗi nhẹ hoặc vùng thay đổi chuỗi nặng từ một vài kháng thể đơn dòng ở người khác nhau. Cũng có hướng tiếp cận đối với sự người hóa được phát triển trong đó thay thế các gốc ở chuột bề mặt bằng các gốc thông thường nhất được tìm thấy ở kháng thể đơn dòng ở người ("tái tạo bề mặt" hoặc "tạo vẻ bề ngoài") và các gốc mà sử dụng những sự xác định khác nhau của sự kéo dài của CDR. Các kháng thể được làm giống người được mô tả dưới đây. Tuy nhiên, kháng thể khảm chứa các vùng thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 4 và 10, hoặc, SEQ ID NO: 16 và 22 cũng được mô tả trong bản mô tả này.

Kháng thể đơn dòng được làm giống người được thu lấy từ kháng thể kháng OX40 ở chuột.

Kháng thể kháng OX40 được làm giống người được phân lập có thể có CDR1 chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 13. Kháng thể kháng OX40 được làm giống người được phân lập có thể có CDR2 chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 hoặc 14. Kháng thể kháng OX40 được làm giống người được phân lập có thể có chuỗi nặng thay đổi CDR3 có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 hoặc 15.

Kháng thể kháng OX40 được làm giống người được phân lập có thể có CDR1 chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 hoặc 19. Kháng thể kháng OX40 được làm giống người được phân lập có thể có chuỗi nhẹ thay đổi CDR2 có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 hoặc 20. Kháng thể kháng OX40 được làm giống người được phân lập có thể có chuỗi nhẹ thay đổi CDR3 có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 hoặc 21.

Kháng thể kháng OX40 được làm giống người được phân lập có thể có chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11 hoặc 23, hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 90% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11 hoặc 23. Kháng thể kháng OX40 được làm giống người được phân lập có thể có chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5 hoặc 17, hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 90% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5 hoặc 17.

Kháng thể kháng OX40 được làm giống người được phân lập có thể có chuỗi nhẹ thay đổi được mã hoá bởi trình tự axit nucleic SEQ ID NO: 12 hoặc 24, hoặc trình tự axit nucleic có độ tương đồng ít nhất là 90% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 hoặc 24. Kháng thể kháng OX40 được làm giống người được phân lập có thể có chuỗi nặng thay đổi được mã hoá bởi trình tự axit nucleic SEQ ID NO: 6 hoặc 18, hoặc trình tự axit nucleic có độ tương đồng ít nhất là 90% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6 hoặc 18.

Sự biểu hiện của kháng thể kháng OX40 được làm giống người

Kháng thể, hoặc phần kháng thể, theo sáng chế có thể được điều chế bằng cách biểu hiện tái tổ hợp gen chuỗi nhẹ và chuỗi nặng immunoglobulin trong tế bào chủ. Để biểu hiện tái tổ hợp kháng thể, tế bào chủ được chuyển nhiễm bằng một hoặc nhiều vector biểu hiện tái tổ hợp mang mảnh ADN mã hóa cho chuỗi nhẹ và chuỗi nặng immunoglobulin của kháng thể sao cho chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được biểu hiện ở tế bào chủ và, tốt hơn nữa, được tiết vào môi trường trong đó tế bào chủ được nuôi cấy, từ môi trường này các kháng thể có thể được thu hồi. Phương pháp tái tổ hợp ADN chuẩn được sử dụng để thu được gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể, kết hợp các gen này vào vector biểu hiện tái tổ hợp và đưa vector này vào tế bào chủ, như các phương pháp được bộc lộ trong tài liệu Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), *Molecular Cloning; Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F. M. et al. (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989) và trong Patent Mỹ số 4,816,397 của Boss et al.

Các kháng thể và mảnh kháng thể và biến thể của chúng có thể được tạo ra từ một số tế bào động vật, tốt hơn nữa là từ tế bào động vật có vú, trong đó tế bào chuột và người được đặc biệt ưu tiên. Ngoài ra, hệ biểu hiện ADN tái tổ hợp có thể gồm hệ mà sử dụng tế bào chủ và cấu trúc biểu hiện mà đã được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền để sản xuất hàm lượng cao của protein cụ thể. Tế bào chủ và cấu trúc biểu hiện này có thể gồm *Escherichia coli*; chứa cấu trúc biểu hiện thu được từ plasmid hoặc virus (bacteriophage); nấm men như *Saccharomyces cerevisiae* hoặc *Pichia pastoris* chứa thể bổ sung hoặc cấu trúc biểu hiện được kết hợp vào nhiễm sắc thể; tế bào côn trùng và các virus như tế bào Sf9 và baculovirus; và tế bào động vật có vú chứa thể bổ sung hoặc cấu trúc biểu hiện được kết hợp vào nhiễm sắc thể (gồm nhưng không giới hạn ở, retrovirus) (các phương pháp, ví dụ, có thể xem trong bản gốc của Verma et al., *J. Immunol. Methods* 216:165-181, 1998). Kháng thể cũng có thể được sản xuất ở cây (các phương pháp này, ví dụ, có thể xem trong Patent Mỹ số 6,046,037; Ma et al., *Science* 268:716-719, 1995) hoặc bằng công nghệ biểu hiện phago (các phương pháp này, ví dụ, có thể xem trong Winter et al., *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455, 1994).

Kháng thể kháng OX40 của người mà thể hiện mức độ hoạt tính và tính đặc hiệu/ái lực liên kết mà là điều mong muốn có thể còn được thao tác bằng tay bởi kỹ thuật ADN tái tổ hợp tiêu chuẩn, ví dụ để chuyển đổi gen vùng thay đổi thành gen chuỗi kháng thể nguyên chiều dài, thành gen mảnh Fab hoặc thành gen scFv. Trong các thao tác này, mảnh ADN mã hóa cho VL hoặc VH liên kết có điều khiển với mảnh ADN khác mã hóa cho protein khác, như vùng không đổi kháng thể hoặc liên kết linh hoạt. Thuật ngữ "liên kết có điều khiển", như được sử dụng trong ngữ cảnh này, được hiểu là hai mảnh ADN được kết hợp sao cho trình tự axit amin được mã hoá bởi hai mảnh ADN này vẫn ở trong khung.

Theo khía cạnh khác, ADN được phân lập mã hóa cho vùng VH có thể được chuyển hóa thành gen chuỗi nặng nguyên chiều dài bằng cách liên kết có điều khiển ADN mã hoá cho VH với phân tử ADN khác mã hóa cho vùng không đổi chuỗi nặng (CH1, CH2 và CH3). Các trình tự của gen vùng không đổi chuỗi nặng ở người là đã biết trong lĩnh vực (xem tài liệu, ví dụ, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) và mảnh ADN bao gồm các vùng này có thể thu được bằng cách khuếch đại PCR tiêu chuẩn. Vùng không đổi chuỗi nặng có thể là vùng không đổi IgG-1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM hoặc IgD và biến thể khác loại bất kỳ ở trong đó như được mô tả trong tài liệu Kabat (, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), nhưng tốt nhất nếu là vùng không đổi IgG1 hoặc IgG4. Đối với gen chuỗi nặng mảnh Fab, ADN mã hoá cho VH có thể được liên kết có điều khiển với phân tử ADN khác chỉ mã hóa cho vùng không đổi chuỗi nặng CH1.

Ngoài ra, kháng thể được làm giống người liên kết vào bề mặt kháng nguyên có thể tương tác với tế bào mang FcR. Sự tương tác này có thể gợi ý chức năng tác động như ADCC và/hoặc tăng cường việc truyền tín hiệu nhờ sự liên kết ngang được điều tiết bởi Fc. Tương tác này có thể là có lợi hoặc có hại đối với việc trị liệu. Tác dụng phụ có hại gồm ớn lạnh, sốt, hạ huyết áp, và trong một số trường hợp, chứng khó thở (Thistlethwaite JR Jr., Cosimi AB, Delmonico FL, *et al.*).

Các tác dụng có hại nhất định có thể bắt nguồn ở phức chất protein tìm thấy trên bề mặt của tế bào T. Do sự hoạt hóa của Tế bào T, phức chất protein tham gia vào sự truyền tín hiệu của tín hiệu được tạo ra qua thụ thể kháng nguyên. Một cách ngắn gọn, sự hoạt hóa của Tế bào T khởi đầu chuỗi sự kiện bao gồm việc liên kết ngang được tăng cường của thụ thể kháng nguyên. Sự liên kết ngang của thụ thể có thể đóng góp vào việc truyền tín hiệu phân bào mạnh mẽ mà dẫn đến việc tạo ra xytokin nhất định như yếu tố gây hoại tử khối u alpha (TNF- α), interleukin-2 (IL-2) và interferon gamma (IFN- γ). Các xytokin này đã biết là gây độc nếu được tạo ra trong lượng lớn.

Ví dụ, mAbs kháng CD3 hiện nay được sử dụng trong việc điều trị bệnh tự miễn gồm bệnh đái tháo đường typ I trong đó tế bào T được điều tiết tấn công chống lại đảo tụy, bộ phận sản xuất insulin (Kaufman A, and Herold K. Anti-CD3 mAbs for treatment of type 1 diabetes *Diabetes Metab Res Rev* 2009; 25: 302–306). Kháng thể kháng CD3 đã biết là ức chế sự phân giải đích bằng tế bào T và tăng cường sự liên kết ngang của thụ thể kháng nguyên CD3. Ngoài ra, cùng với hoạt tính gây phân bào tiềm năng của nó, kháng thể kháng CD3 đã được biết là chất cảm ứng của xytokin, cụ thể, yếu tố gây hoại tử khối u alpha (TNF- α), interleukin-2 (IL-2) và interferon gamma (IFN- γ). Sự giải phóng cực lớn xytokin, cụ thể là TNF- α từ tế bào T để đáp ứng lại với thuốc (Chatenoud L.) tạo ra tác dụng gây độc. Các tác dụng phụ không mong muốn đã góp phần vào sự liên kết ngang tế bào T mang phân tử CD3 và các tế bào mang FcR mà liên kết với phần Fc của kháng thể. Sự liên kết ngang hoạt hóa cả tế bào T và tế bào mang FcR dẫn đến sự giải phóng lượng lớn xytokin như nêu trên.

Tương tự, tác dụng phụ không mong muốn tiềm năng có thể dẫn đến việc sử dụng kháng thể kháng OX40. Ví dụ, các kháng thể kháng OX40 mà liên kết với tế bào T biểu hiện OX40 cũng có thể liên kết với tế bào mang FcR và hoạt hóa việc sản xuất xytokin mà có thể có lợi hoặc có hại đối với bệnh nhân được điều trị bằng kháng thể. Để khắc phục vấn đề này, các tác giả sáng chế đã thiết kế và thể hiện trong bản mô tả này phương pháp gây đột biến phần FcR của kháng thể kháng OX40 để tránh tác dụng gây độc và tạo ra đột biến đối với phần FcR là điều mong muốn.

Vị trí của IgG1 ở người mà tương tác với FcR (CD16, CD32 và CD64) là đã biết. Nó nằm ở miền CH2 trên. Axit amin quan trọng nhất là hai gốc Leu ở các vị trí 234 và 235. Bằng cách gây đột biến hai gốc này thành hai gốc Ala, tương tác của IgG1 với tất cả các FcRs được loại bỏ. Kháng CD3 được làm giống người kết hợp các đột biến này (HuOKT3AA), là thuốc an toàn hơn nhiều và có cơ chế tác dụng khác với cơ chế tác dụng của HuOKT3. Xem tài liệu, ví dụ, patent Mỹ số 6, 491,916.

Các vị trí của thể đột biến AA được thể hiện dưới đây:

234 235

---A---P---E---L---L---G---G---P--- CH2 trên của IgG1 kiểu đại

---A---P---E---A---A---G---G---P--- AA CH2 trên của thể đột biến IgG1

Hu222AA và Hu122AA được mô tả trong bản mô tả này có thể chứa các đột biến này. Nếu hệ thử nghiệm chứa tế bào mang FcR, bạn có thể xem sự khác nhau giữa kiểu đại và thể đột biến AA. Theo cách khác, hai kháng thể cần được đối xử giống nhau.

ADN được phân lập mã hóa cho vùng VL có thể được chuyển hóa thành gen chuỗi nhẹ nguyên chiều dài (cũng như gen chuỗi nhẹ Fab) bằng cách liên kết có điều khiển ADN mã hóa cho VL với phân tử ADN khác mã hóa cho vùng không đổi chuỗi nhẹ, CL. Các trình tự của vùng không đổi gen chuỗi nhẹ ở người là đã biết trong lĩnh vực (xem tài liệu, ví dụ, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) và mảnh AND chứa các vùng này có thể thu được bằng cách khuếch đại PCR tiêu chuẩn. Vùng không đổi chuỗi nhẹ có thể là vùng không đổi kappa hoặc lambda.

Để tạo ra gen scFv, các mảnh ADN mã hóa cho VH và VL liên kết có điều khiển với mảnh khác mã hóa cho liên kết linh hoạt, ví dụ, mã hóa cho trình tự axit amin (Gly.sub.4-Ser).sub.3, sao cho các trình tự VH và VL có thể được biểu hiện dưới dạng protein mạch đơn liền kề, với các vùng VL và VH được kết hợp bằng

liên kết linh hoạt (xem tài liệu, ví dụ, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554.

Trình tự (các) cải biến axit amin của các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này được tạo khuôn. Ví dụ, có thể mong muốn cải thiện ái lực liên kết và/hoặc các tính chất sinh học khác của kháng thể. Biến thể trình tự axit amin của kháng thể được điều chế bằng cách đưa sự thay đổi hợp nucleotit thích vào axit nucleic kháng thể, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Cải biến này bao gồm, ví dụ, sự làm khuyết, và/hoặc sự cài xen và/hoặc sự thế của các gốc trong trình tự axit amin của kháng thể. Dạng kết hợp bất kỳ của sự làm khuyết, sự cài xen, và sự thế được tạo ra để có được cấu trúc cuối cùng, với điều kiện là cấu trúc cuối cùng mang các đặc tính mong muốn. Sự thay đổi axit amin có thể được đưa vào trong trình tự axit amin kháng thể vào lúc tạo ra trình tự này.

Phương pháp hữu dụng để xác định các gốc hoặc các vùng nhất định của kháng thể mà là các vị trí được ưu tiên để gây đột biến được gọi là "gây đột biến quét alanin" như được mô tả trong tài liệu Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085. Ở đây, gốc hoặc nhóm chứa các gốc đích được nhận diện (ví dụ, các gốc tích điện như arg, asp, his, lys, và glu) và axit amin trung tính hoặc tích điện âm (tốt nhất nếu là alanin hoặc polyalanin) để tác động đến tương tác của axit amin với kháng nguyên. Các vị trí axit amin chứng tỏ tính miễn cảm chức năng với sự thế sau đó được tinh chế bằng cách đưa tiếp biến thể hoặc biến thể khác ở các vị trí thế. Như vậy, trong khi vị trí để đưa sự cải biến trình tự axit amin được xác định trước, bản chất của đột biến không cần phải được xác định trước. Ví dụ, để phân tích hiệu quả của đột biến ở vị trí nhất định, việc sàng lọc ala hoặc sự gây đột biến ngẫu nhiên được thực hiện ở bộ ba mã hóa hoặc vùng đích và globulin miễn dịch được biểu hiện được sàng lọc về hoạt tính mong muốn.

Sự cài xen trình tự axit amin bao gồm sự dung hợp đầu tận amino và/hoặc carboxyl trong chiều dài từ một gốc đến polypeptit chứa hàng trăm gốc hoặc hơn, cũng như các đoạn cài xen bên trong trình tự của một hoặc nhiều gốc axit amin. Ví dụ về các đoạn cài xen đầu tận gồm kháng thể có gốc methionyl đầu tận N hoặc

kháng thể được dung hợp vào polypeptit gây độc tế bào. Biến thể cải xen khác của phân tử kháng thể gồm sự dung hợp vào đầu tận N hoặc C của kháng thể vào enzym (ví dụ đối với ADEPT) hoặc polypeptit mà làm tăng chu kỳ bán rã huyết thanh của kháng thể. Dạng khác của biến thể axit amin của kháng thể làm thay đổi ban đầu mẫu glycosyl hoá của kháng thể. Việc làm thay đổi này bao gồm việc làm khuyết một hoặc nhiều gốc cacbohydrat được tìm thấy ở kháng thể, và/hoặc bổ sung một hoặc nhiều vị trí glycosyl hoá mà không có mặt trong kháng thể.

Dạng khác của biến thể là biến thể thể axit amin. Các biến thể này có ít nhất một gốc axit amin trong phân tử kháng thể được thế bằng gốc khác. Các vị trí mong muốn nhất để gây đột biến thể bao gồm vùng siêu biến, nhưng cũng bao gồm sự thay đổi FR. Sự thể bảo toàn được thể hiện trong Bảng 1 của patent Mỹ số 7,812,133, từ Col. 43, ls. 55 đến Col. 44 l. 49, và trong phần "sự thể được ưu tiên". Nếu sự thể này gây ra sự thay đổi hoạt tính sinh học, thì sự thay đổi cơ bản hơn, được gọi là " sự thể được lấy làm ví dụ " trong Bảng 1, hoặc như được mô tả thêm dưới đây trong về các nhóm axit amin, có thể được đưa vào và sản phẩm được sàng lọc.

Ngoài ra, sự cải biến cơ bản các tính chất sinh học của kháng thể được hoàn thành bằng cách lựa chọn sự thể mà khác đáng kể về hiệu quả của chúng trong việc duy trì (a) cấu trúc của khung polypeptit trong khu vực thể, ví dụ, dưới dạng cấu hình tấm hoặc xoắn, (b) sự tích điện hoặc tính kỵ nước của phân tử ở vị trí đích, hoặc (c) khối mạch nhánh. Các gốc có trong tự nhiên được chia ra thành các nhóm dựa trên tính chất mạch nhánh chung: (1) kỵ nước: norleuxin, met, ala, val, leu, ile; (2) trung tính ưa nước: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) axit: asp, glu; (4) bazơ: his, lys, arg; (5) gốc ảnh hưởng đến sự định hướng mạch: gly, pro; và (6) thơm: trp, tyr, phe. Sự thể không bảo toàn sẽ dẫn đến sự trao đổi thành phần của một trong số nhóm này với nhóm khác.

Để biểu hiện kháng thể, hoặc phần kháng thể được mô tả trong bản mô tả này, ADN mã hóa cho chuỗi nhẹ và chuỗi nặng một phần hoặc nguyên chiều dài, thu được như được mô tả trên đây, được cải xen vào vectơ biểu hiện sao cho gen được liên kết có điều khiển với trình tự kiểm soát phiên mã và dịch mã. Trong bản

mô tả này, thuật ngữ "liên kết có điều khiển" được hiểu là gen kháng thể được ghép vào vector sao cho trình tự kiểm soát phiên mã và dịch mã bên trong vector đáp ứng chức năng dự kiến của chúng trong việc điều tiết sự phiên mã và sự dịch mã của gen kháng thể. Vector biểu hiện và trình tự kiểm soát biểu hiện được chọn tương thích với tế bào chủ biểu hiện được sử dụng. Gen chuỗi nhẹ kháng thể và gen chuỗi nặng kháng thể có thể được cài xen vào các vector khác nhau hoặc, tốt hơn là, cả hai gen được cài xen vào cùng một vector biểu hiện. Gen kháng thể được cài xen vào vector biểu hiện bằng phương pháp tiêu chuẩn (ví dụ, nối các vị trí cắt giới hạn bổ sung trên mảnh gen kháng thể và vector, hoặc cắt cụt đầu nối nếu không có các vị trí cắt giới hạn).

Như được thể hiện trên Fig. 23, một cấu trúc dạng sơ đồ của vector biểu hiện đối với kháng thể Hu106-222 IgG1/kappa. Tiến theo chiều kim đồng hồ từ vị trí Sall ở phần trên, plasmit chứa đơn vị phiên mã chuỗi nặng bắt đầu bằng gen khởi đầu sớm ngay cạnh chính cytomegalovirus ở người (CMV) và gen tăng cường (gen khởi đầu CMV) để khởi đầu sự phiên mã của gen chuỗi nặng kháng thể. Sau gen khởi đầu CMV là exon VH, trình tự hệ gen chứa vùng không đổi chuỗi nặng gamma-1 ở người gồm CH1, vùng bản lề, các exon CH2 và CH3 với các intron xen kẽ, và vị trí polyadenyl hóa ở sau exon CH3. Sau trình tự gen chuỗi nặng, đơn vị phiên mã chuỗi nhẹ bắt đầu bằng gen khởi đầu CMV, sau đó là exon VL và trình tự hệ gen chứa exon vùng không đổi chuỗi kappa ở người (CL) với một phần của intron ở trước nó, và vị trí polyadenyl hóa sau exon CL. Sau gen chuỗi nhẹ là gen khởi đầu sớm SV40 (Gen khởi đầu SV40), gen xanthin guanin phosphoribosyl transferaza ở *E. coli* (gpt), và phân đoạn chứa vị trí polyadenyl hóa SV40 (vị trí SV40 poly(A)). Cuối cùng, plasmit chứa một phần của plasmit pUC19, gồm điểm mở đầu sao chép vi khuẩn (ori pUC) và gen beta-lactamaza (beta lactamaza). Các vị trí của các vị trí enzym giới hạn liên quan được thể hiện trong hình vẽ.

Vector biểu hiện tái tổ hợp có thể mã hóa cho peptit tín hiệu mà tạo điều kiện thuận lợi cho sự tiết chuỗi kháng thể từ tế bào chủ. Gen chuỗi kháng thể có thể được tách dòng vào vector sao cho peptit tín hiệu được liên kết trong khung với đầu tận amino của gen chuỗi kháng thể. Peptit tín hiệu có thể là peptit tín hiệu

immunoglobulin hoặc peptit tín hiệu khác loại (tức là, peptit tín hiệu từ protein không phải immunoglobulin).

Như nêu trên, ngoài gen chuỗi kháng thể, vector biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế mang trình tự điều khiển mà điều khiển sự biểu hiện của gen chuỗi kháng thể trong tế bào chủ. Thuật ngữ "trình tự điều khiển" bao gồm gen khởi, gen tăng cường và các yếu tố điều khiển biểu hiện khác (ví dụ, tín hiệu polyadenyl hóa) mà điều khiển sự phiên mã hoặc sự dịch mã của gen chuỗi kháng thể. Trình tự điều khiển được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Tốt hơn là việc thiết kế của vector biểu hiện, bao gồm việc lựa chọn trình tự điều khiển có thể tùy thuộc vào các yếu tố như lựa chọn tế bào chủ để biến nạp, mức độ biểu hiện của protein mong muốn, v.v. trình tự điều khiển được ưu tiên đối với tế bào chủ biểu hiện động vật có vú gồm các yếu tố virus mà mang lại hàm lượng cao của protein biểu hiện ở tế bào động vật có vú, như gen khởi đầu và/hoặc gen tăng cường thu được từ cytomegalovirus (CMV) (như gen khởi đầu /gen tăng cường CMV), Simian Virus 40 (SV40) (như Gen khởi đầu /gen tăng cường SV40), adenovirus, (ví dụ, gen khởi đầu muộn chính adenovirus (AdMLP)) và polyoma. Để mô tả thêm về yếu tố điều hòa virus, và trình tự của chúng, xem tài liệu ví dụ, Patent Mỹ số 5,168,062 của Stinski, Patent Mỹ số 4,510,245 của Bell et al. và Patent Mỹ số 4,968,615 của Schaffner et al., Patent Mỹ số 5,464,758 của Bujard et al. và Patent Mỹ số 5,654,168 bởi Bujard et al.

Ngoài gen chuỗi kháng thể và trình tự điều khiển, vector biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế có thể mang các trình tự bổ sung, như trình tự điều hòa mức độ sao chép của vector trong tế bào chủ (ví dụ, điểm mở đầu sao chép) và gen đánh dấu chọn lọc. Gen đánh dấu chọn lọc tạo điều kiện thuận lợi cho việc chọn lọc của tế bào chủ mà vector đã được đưa vào (xem tài liệu, ví dụ, patent Mỹ số 4,399,216, 4,634,665 và 5,179,017, tất cả đều của Axel et al.). Ví dụ, thông thường gen đánh dấu chọn lọc mang lại tính kháng thuốc, như G418, hygromycin hoặc metotrexat, cho tế bào chủ mà vector đã được đưa vào. Gen đánh dấu chọn lọc được ưu tiên gồm gen dihydrofolat reductaza (DHFR) (để sử dụng trong tế bào chủ dhfr.sup.- với sự chọn lọc/khuếch đại metotrexat) và gen neo (để chọn lọc G418).

Đối với sự biểu hiện của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, (các) vector biểu hiện mã hóa cho chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chuyển nhiễm vào tế bào chủ bằng kỹ thuật tiêu chuẩn. Các dạng khác nhau của thuật ngữ "sự chuyển nhiễm" nhằm bao hàm hàng loạt kỹ thuật thường được sử dụng để đưa ADN ngoại sinh vào tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân chuẩn, ví dụ, đục lỗ điện, kết tủa canxi-phosphat, sự chuyển nhiễm DEAE-dextran và phương pháp tương tự. Mặc dù theo lý thuyết có thể biểu hiện các kháng thể theo sáng chế trong hoặc tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân chuẩn, sự biểu hiện của các kháng thể trong các tế bào nhân chuẩn, và tốt nhất nếu là tế bào chủ động vật có vú, là được ưu tiên nhất vì các tế bào nhân chuẩn, và cụ thể tế bào động vật có vú, là phù hợp hơn các tế bào nhân sơ để lắp ráp và tiết kháng thể có hoạt tính miễn dịch và được gấp lại thích hợp. Tế bào chủ động vật có vú để biểu hiện kháng thể tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này gồm Chinese Hamster Ovary (tế bào CHO) (như tế bào dhfr-CHO, được bộc lộ trong tài liệu Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, được sử dụng với gen đánh dấu chọn lọc DHFR, ví dụ, như được mô tả trong tài liệu R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), tế bào u tủy NS0, tế bào COS và tế bào SP2. Khi vector biểu hiện tái tổ hợp mã hóa cho gen kháng thể được đưa vào tế bào chủ động vật có vú, các kháng thể được sản xuất bằng cách nuôi cấy tế bào chủ trong khoảng thời gian đủ để cho phép biểu hiện kháng thể trong tế bào chủ hoặc, sự tiết của kháng thể vào môi trường nuôi cấy mà nuôi cấy tế bào chủ. Các kháng thể có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp tinh chế protein tiêu chuẩn.

Tế bào chủ cũng có thể được sử dụng để sản xuất một phần của kháng thể nguyên vẹn, như mảnh Fab hoặc phân tử scFv. Cần hiểu rằng các thay đổi của phương pháp trên đây cũng thuộc phạm vi của sáng chế. Ví dụ, có thể mong muốn chuyển nhiễm tế bào chủ với ADN mã hóa cho hoặc chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng (chứ không phải là cả hai) của kháng thể theo sáng chế. Công nghệ ADN tái tổ hợp cũng có thể được sử dụng để loại bỏ một số hoặc tất cả ADN mã hóa cho hoặc hoặc cả hai chuỗi nhẹ và chuỗi nặng mà là không cần thiết để liên kết với phân tử OX40 được biểu hiện từ phân tử ADN được làm cùn cũng được bao hàm bởi các kháng thể theo sáng chế. Ngoài ra, kháng thể hai chức năng có thể được tạo ra mà một

chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ là kháng thể theo sáng chế và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ còn lại là đặc hiệu đối với kháng nguyên không phải là OX40 bằng cách tạo liên kết ngang kháng thể theo sáng chế với kháng thể thứ hai bằng phương pháp tạo liên kết ngang hóa học tiêu chuẩn.

Dược phẩm và cách dùng

Các kháng thể và phân kháng thể theo sáng chế có thể được kết hợp thành dược phẩm thích hợp để sử dụng cho đối tượng. Thông thường, dược phẩm chứa kháng thể hoặc phân kháng thể theo sáng chế và chất mang dược dụng. Trong bản mô tả này, " chất mang dược dụng " gồm bất kỳ và tất cả các dung môi, môi trường phân tán, chất bao, chất kháng khuẩn và chất diệt nấm, chất đẳng trương và làm trễ hấp thu, và chất tương tự mà tương thích về mặt sinh lý. Ví dụ về chất mang dược dụng gồm một hoặc nhiều chất như nước, nước muối, nước muối đậm phosphat, dextroza, glyxerol, etanol và chất tương tự, cũng như hỗn hợp của chúng. Trong nhiều trường hợp, tốt hơn là bao gồm chất đẳng trương, ví dụ, đường, rượu đa chức như manitol, sorbitol, hoặc natri clorua trong hợp phần. Chất mang dược dụng có thể còn gồm lượng nhỏ của chất hỗ trợ như chất làm ẩm hoặc chất nhũ tương hóa, chất bảo quản hoặc chất đệm, mà tăng cường thời hạn sử dụng hoặc hiệu lực của kháng thể hoặc phân kháng thể.

Các kháng thể và phân kháng thể theo sáng chế có thể được kết hợp vào dược phẩm thích hợp để sử dụng ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, trong tĩnh mạch, dưới da, trong màng bụng, trong cơ). Hợp phần theo sáng chế có thể ở nhiều dạng. Các dạng này bao gồm, ví dụ, dạng lỏng, dạng bán rắn và dạng liều rắn, như dung dịch lỏng (ví dụ, có thể tiêm được và có thể pha được), thể phân tán hoặc huyền phù, viên nén, viên tròn, bột, liposom và thuốc đạn. Dạng được ưu tiên tùy thuộc vào phương thức sử dụng và ứng dụng trị liệu dự kiến. Hợp phần thông thường là ở dạng có thể tiêm được hoặc có thể pha được, như hợp phần tương tự với dạng được sử dụng để gây miễn dịch chủ động cho người bằng các kháng thể khác. Kháng thể có thể được sử dụng bằng cách truyền hoặc tiêm trong tĩnh mạch hoặc tiêm trong cơ hoặc dưới da.

Con đường và/hoặc phương thức sử dụng sẽ thay đổi tùy thuộc vào kết quả mong muốn. Theo phương án nhất định, hoạt chất có thể được điều chế bằng chất mang mà sẽ bảo vệ hoạt chất này chống lại sự giải phóng nhanh chóng, như chế phẩm được kiểm soát giải phóng, gồm các vật cấy ghép, cao dán qua da, và hệ chuyển thuốc được vi bao. Polyme dễ bị vi sinh vật phá hủy, tương hợp sinh học có thể được sử dụng, như etylen vinyl axetat, polyanhydrit, axit polyglycolic, collagen, polyorthoeste, và axit polylactic. Nhiều phương pháp điều chế chế phẩm này đã được cấp bằng độc quyền sang chế hoặc thường đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Xem tài liệu, ví dụ, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Hoạt chất bổ sung cũng có thể được kết hợp vào hợp phần. Theo phương án nhất định, kháng thể hoặc phân kháng thể theo sáng chế đồng được bào chế với và/hoặc được đồng sử dụng với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung mà là hữu dụng để điều trị các rối loạn trong đó sự bất hoạt OX40 là gây hại. Ví dụ, kháng thể hoặc phân kháng thể kháng OX40 theo sáng chế có thể được đồng bào chế và/hoặc được đồng sử dụng với một hoặc nhiều kháng thể bổ sung mà liên kết đích khác (ví dụ, kháng thể mà liên kết xytokin khác hoặc liên kết với phân tử bề mặt tế bào). Ngoài ra, một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng hỗn hợp với hai hoặc hơn hai chất trị liệu nêu trên. Sự kết hợp các phương pháp điều trị có thể có lợi nếu sử dụng liều lượng thấp hơn của chất trị liệu được sử dụng, như vậy tránh được độc tính hoặc biến chứng có thể có liên quan đến các phương pháp điều trị đơn lẻ khác nhau. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng kỹ thuật này hiểu rõ rằng khi các kháng thể theo sáng chế được sử dụng làm một phần của việc trị liệu kết hợp, liều lượng thấp hơn của kháng thể có thể là điều mong muốn hơn là khi kháng thể được sử dụng riêng lẻ cho đối tượng (ví dụ, tác dụng trị liệu hiệp đồng có thể đạt được bằng cách sử dụng trị liệu kết hợp mà, bằng cách đó, cho phép sử dụng liều lượng thấp hơn của của kháng thể để đạt được tác dụng trị liệu mong muốn.

Các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này, hoặc các phân liên kết kháng nguyên của chúng có thể được sử dụng một mình hoặc ở dạng hỗn hợp để điều trị

các bệnh này. Cần hiểu rằng các kháng thể hoặc phân liên kết kháng nguyên của chúng có thể được sử dụng một mình hoặc ở dạng hỗn hợp với chất bổ sung, ví dụ, chất trợ liệu, chất bổ sung được chọn bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng cho mục đích dự kiến. Ví dụ, bổ sung chất có thể là chất trợ liệu được xác định trong lĩnh vực là hữu dụng để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh cần được điều trị bằng kháng thể được nêu trong bản mô tả này. Chất bổ sung còn có thể là chất mà ảnh hưởng có lợi đến việc tạo thành hợp phân trợ liệu ví dụ, chất mà ảnh hưởng đến độ nhớt của hợp phân.

Dược phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể gồm "lượng hữu hiệu để trợ liệu" hoặc "lượng hữu hiệu để phòng bệnh" của kháng thể hoặc phân kháng thể theo sáng chế. "Lượng hữu hiệu để trợ liệu" chỉ lượng hữu hiệu, ở liều lượng và trong thời gian thời gian cần thiết, để đạt được kết quả trợ liệu mong muốn. Lượng hữu hiệu để trợ liệu của kháng thể hoặc phân kháng thể có thể thay đổi theo các yếu tố như trạng thái bệnh, tuổi, giới tính, và khối lượng cá thể; và khả năng của kháng thể hoặc phân kháng thể để gây ra đáp ứng mong muốn ở cá thể. Lượng hữu hiệu để trợ liệu còn là lượng trong đó tác dụng gây độc hoặc gây hại bất kỳ của kháng thể hoặc phân kháng thể có nhiều tác dụng hơn bởi hiệu quả có lợi về mặt trợ liệu. "Lượng hữu hiệu để phòng bệnh" chỉ lượng hữu hiệu, ở liều lượng và trong thời gian thời gian cần thiết, để đạt được kết quả phòng bệnh mong muốn.

Chế độ liều có thể được điều chỉnh để mang lại đáp ứng mong muốn tối ưu (ví dụ, đáp ứng trợ liệu hoặc phòng bệnh). Ví dụ, một liều thuốc tiêm nhanh có thể được sử dụng, một vài liều được chia nhỏ có thể được sử dụng trong một thời gian hoặc liều lượng có thể được làm giảm hoặc được tăng lên theo tỷ lệ như được thể hiện bởi tình trạng khẩn cấp của việc trợ liệu. Đặc biệt có lợi là điều chế hợp phân dùng ngoài đường tiêu hóa ở dạng liều đơn vị để dễ sử dụng và có liều lượng đồng đều. Dạng liều đơn vị trong bản mô tả này dùng để chỉ đơn vị tiết vật lý thích hợp làm liều đơn vị cho đối tượng động vật có vú cần được điều trị; mỗi đơn vị chứa lượng xác định của hoạt chất được tính toán để tạo ra tác dụng trợ liệu mong muốn kết hợp với chất mang được dùng cần thiết. Đặc điểm của các dạng đơn vị liều lượng được xác định bởi và phụ thuộc trực tiếp vào (a) các đặc tính duy nhất của

hoạt chất và hiệu quả trị liệu hoặc phòng bệnh cụ thể cần đạt được, và (b) hạn chế vốn có trong lĩnh vực bào chế hoạt chất để điều trị sự nhạy cảm của cá thể.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ I

Kháng thể đơn dòng IgG1/kappa 106-222 khám và được làm giống người (lần lượt là Ch222 và Hu222) được tinh chế từ phần dịch nổi của môi trường nuôi cấy của thể chuyển nhiễm ổn định NS0 tương ứng bằng cách sử dụng cột protein A như được mô tả trong phụ lục A và B. Hu222 được rửa giải từ cột bằng hai cách khác nhau. Một cách ngắn gọn, lô I Hu222 được rửa giải bằng chất đệm pH thấp và lô II bằng chất đệm rửa giải Pierce's Gentle Ag/Ab. Hiệu suất của Hu222 tốt hơn khi chất đệm pH thấp được sử dụng để rửa giải. Ch222 được rửa giải từ cột bằng chất đệm rửa giải Gentle Ag/Ab.

Kháng thể Hu222 lô I và II đã được tinh chế được xác định đặc điểm bằng SDS-PAGE dọc theo 106-222 ở chuột nhất theo phương pháp tiêu chuẩn. Năm μ g của mỗi kháng thể được phân tích trong điều kiện khử. Như được thể hiện trên Fig. 21, mỗi trong số các kháng thể Hu222 lô I và II bao gồm chuỗi nặng có khối lượng phân tử khoảng 50 kD và chuỗi nhẹ có khối lượng phân tử khoảng 25 kD. Độ tinh khiết của kháng thể Hu222 lô I và II được thể hiện là lớn hơn 95%.

Độ tạp nhiễm nội độc tố trong các kháng thể được làm giống người được phân tích bằng bộ kit Lonza's Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL-1000. Hàm lượng nội độc tố là nhỏ hơn 0,5 EU/mg protein đối với cả hai kháng thể Hu222 lô I và II.

Đặc tính của Hu106-222 để liên kết với các tế bào L/OX40

Việc liên kết của các kháng thể 106-222, Ch106-222 và Hu106-222 ở chuột nhất với OX40 được kiểm tra trong thử nghiệm liên kết FACS với các tế bào L/hOX40 gần như theo quy trình được cung cấp bởi Dr. Laura Bover. Các kháng thể liên kết với các tế bào L/hOX40 được phát hiện bằng kháng thể IgG kháng

chuột ở dê được gắn nhãn PE (đối với 106-222 ở chuột nhất) hoặc kháng thể IgG kháng người ở dê được gắn nhãn PE (đối với Ch106 và Hu106).

Fig. 22 thể hiện phân tích của các kháng thể 106-222, Ch106 và Hu106-222 (Lô II) ở chuột nhất để liên kết với các tế bào L/OX40. Đường cong chuẩn độ của Hu106-222 (Lô II) gần giống với đường cong chuẩn độ của Ch106-222, thể hiện rằng ái lực liên kết kháng nguyên của 106-222 ở chuột nhất được giữ lại trong Hu106-222. Đường cong chuẩn độ của 106-222 ở chuột nhất tương tự với đường cong chuẩn độ của Ch106 và Hu106; tuy nhiên, do sự khác biệt của các kháng thể thứ cấp, dữ liệu chỉ thể hiện rằng ái lực của 106-222 ở chuột nhất là tương tự với ái lực của Hu106-222.

Fig. 24 thể hiện sự so sánh giữa các kháng thể Hu106-222 lô I và II để liên kết với các tế bào L/hOX40. Mặc dù cần phải phân tích tiếp, ái lực của hai lô của Hu106-222 được thể hiện là tương tự, nếu không phải là giống hệt, với ái lực của mỗi lô khác. Do đó, sự rửa giải bằng axit của Hu106-222 từ cột protein A dường như không ảnh hưởng đến ái lực của nó.

Tinh chế Ch106-222

Thế chuyển nhiễm ổn định NS0 C8 được nuôi cấy trong 500 ml môi trường SFM thể lai của Invitrogen trong chai có con lăn đến khi cạn kiệt. Môi trường nuôi cấy được quay tròn trong ống ly tâm Corning dung tích 250 ml (Cat# 430776) trong máy ly tâm Beckman Coulter's Allegra X-12R (2000 vòng/phút trong 15 phút). Phần dịch nổi của môi trường nuôi cấy được nạp lên trên cột 1 ml GE Healthcare HiTrap MabSelect SuRe (Cat# 11-034-95) sử dụng bơm Pharmacia P1. Cột được rửa bằng Nước muối được đệm Tris (Pierce, Cat# 28379) và được rửa giải bằng chất đệm rửa giải Pierce's Gentle Ag/Ab (Cat # 21027). Các phân đoạn (khoảng 1 ml) được thu gom và OD của chúng ở 280 nm được đọc.

Phân đoạn #	OD ở 280 nm
3	0,12
4	0,30
5	0,18
6	0,11

Các phân đoạn từ 3 đến 6 được gộp lại (thể tích = 3,0 ml, OD ở 280 nm = 0,14). Các phân đoạn đã được gộp lại được loại muối trên cột môi trường 10 ml Sephadex G25 trong PBS. Các phân đoạn 1 ml được thu gom.

Phân đoạn #	OD ở 280 nm
5	0,09
6	0,19
7	0,12
8	0,12
9	0,00

Các phân đoạn từ 6 đến 9 được gộp lại (thể tích = 3,0 ml, OD ở 280 nm = 0,11). Các phân đoạn đã được gộp lại được thẩm tách qua đêm trong PBS. Sau khi thẩm tách, thể tích là 3,0 ml và OD ở 280 nm là 0,19. Chế phẩm này được gọi là Ch106, lô 8/31/09, với nồng độ bằng 0,13 mg/ml.

Tinh chế Hu106-222

Thế chuyển nhiễm ổn định NS0 1-C6 được nuôi cấy trong 500 ml môi trường SFM thế lai của Invitrogen trong chai có con lăn đến khi cạn kiệt. Môi trường nuôi cấy được quay tròn trong ống ly tâm Corning dung tích 250 ml (Cat# 430776) trong máy ly tâm Beckman Coulter's Allegra X-12R (2000 vòng/phút trong 15 phút).

Lô 1: 150 ml phần dịch nổi của môi trường nuôi cấy được nạp lên trên cột 1ml GE Healthcare HiTrap MabSelect SuRe (Cat# 11-034-95) sử dụng bơm Pharmacia P1. Cột được rửa bằng PBS và kháng thể đã được liên kết được rửa giải bằng 0,1M glyxin-HCl, 0,1 M NaCl (pH 3,0). Các phân đoạn đã được rửa giải (1 ml mỗi phân đoạn) được thu gom vào các ống chứa 50 µl 1M Tris-HCl (pH 8,0).

Phân đoạn #	OD ở 280 nm
2	0,88
3	2,84
4	1,29
5	0,63
6	0,18

Các phân đoạn từ 2 đến 5 được gộp lại (thể tích = 4,2 ml, OD ở 280 nm = 1,59). Các phân đoạn đã được gộp lại được thẩm tách qua đệm trong PBS. Sau khi thẩm tách, thể tích là 4,2 ml và OD ở 280 nm là 1,54. Dung dịch kháng thể (lô 9/18/09 I; 1,1 mg/ml) được lọc-khử trùng.

Lô II:

Phần dịch nổi còn lại của môi trường nuôi cấy (350 ml) được nạp lên trên cột 1ml GE Healthcare HiTrap MabSelect SuRe sử dụng bơm Pharmacia P1. Cột được rửa bằng nước muối được đệm Tris và được rửa giải bằng chất đệm rửa giải Gentle Ag/Ab. Phân đoạn (khoảng 1 ml) được thu gom và OD của chúng được đọc ở 280 nm.

Phân đoạn #	OD ở 280 nm
2	0,12
3	0,85
4	2,17
5	1,47
6	1,02
7	0,81
8	0,66
9	0,54
10	0,44
11	0,46

Các phân đoạn từ 3 đến 7 được gộp lại (thể tích = 4,2 ml, OD ở 280 nm = 1,22). Cột được rửa lại với nước muối được đệm Tris và kháng thể được rửa giải bằng 0,1M glyxin-HCl, 0,1M NaCl (pH 3,0) để kiểm tra xem việc rửa giải bởi chất đệm rửa giải GentleAg/Ab có hiệu quả hay không.

Phân đoạn #	OD ở 280 nm
1	0,05
2	0,05
3	1,23
4	0,49
5	0,10

Các phân đoạn từ 3 đến 7 được rửa giải bằng chất đệm rửa giải GentleAg/Ab được gộp lại và được loại muối lên trên cột môi trường 10 ml Sephadex G25 trong PBS. Các phân đoạn bằng 1 ml được thu gom.

Phân đoạn #	OD ở 280 nm
4	0,38
5	0,96
6	1,38
7	1,33
8	1,10
9	0,12

Các phân đoạn từ 5 đến 8 được gộp lại (thể tích = 4,0 ml, OD ở 280 nm = 1,12). Các phân đoạn đã được gộp lại được thẩm tách qua đệm trong PBS. Sau khi thẩm tách, thể tích là 4,0 ml và OD ở 280 nm là 1,12. Dung dịch kháng thể (lô 9/18/09 II; 0,8 mg/ml) được lọc-khử trùng.

Phương pháp rửa giải muối cao với chất đệm rửa giải Pierce's Gentle Ag/Ab là không hiệu quả như phương pháp pH thấp để rửa giải kháng thể IgG1 ở người đã được liên kết từ cột protein A. Vì các kháng thể không được rửa giải trong đỉnh nhọn với chất đệm rửa giải Gentle Ag/Ab, cần gộp nhiều phân đoạn để thu gom IgG đã được rửa giải và loại muối các phân đoạn đã được gộp lại này trước khi thẩm tách. Profin rửa giải kém với chất đệm rửa giải Gentle Ag/Ab và bước tinh chế thêm ảnh hưởng đến hiệu suất của kháng thể. Khuyến rằng phương pháp rửa giải muối cao chỉ được sử dụng nếu IgG cần được tinh chế là không bền với axit.

Ví dụ II

Tinh chế các kháng thể Ch119-122 và Hu119-122

Kháng thể đơn dòng IgG1/kappa 119-122 khảm (Ch119) được tinh chế từ phần dịch nổi của môi trường nuôi cấy của thể chuyển nhiễm ổn định NS0 tương ứng (dòng G11) sinh trưởng trong môi trường thể lai-SFM (Invitrogen) sử dụng cột protein A. Sau khi rửa giải với chất đệm rửa giải Pierce's Gentle Ag/Ab, chất đệm của Ch119 được đổi thành PBS bởi lọc gel và sau đó thẩm tách. Nồng độ của Ch119 là 0,21 mg/ml.

Kháng thể đơn dòng IgG1/kappa 119-122 được làm giống người (Hu122) được tinh chế từ phần dịch nổi của môi trường nuôi cấy của thể chuyển nhiễm ổn định NS0 tương ứng (dòng 2F5) sinh trưởng trong môi trường thể lai-SFM sử dụng cột protein A. Hu106-222 được rửa giải từ cột bằng chất đệm pH thấp, được trung hoà bằng 1 M Tris-HCl (pH 8,0), và được thẩm tách trong PBS. Nồng độ của Hu122 là 1,6 mg/ml.

Hu106-222 đã được tinh chế được xác định đặc điểm bởi SDS-PAGE dọc theo 119-122 ở chuột nhắt theo phương pháp tiêu chuẩn. Năm μ g mỗi kháng thể được phân tích trong điều kiện khử. Như được thể hiện trên Fig. 25, Hu119-122 gồm chuỗi nặng có khối lượng phân tử khoảng 50 kD và chuỗi nhẹ có khối lượng phân tử khoảng 25 kD. Độ tinh khiết của Hu119 được thể hiện là lớn hơn 95%.

Đặc tính của Hu119-122 để liên kết với các tế bào L/hOX40

Sự liên kết của các kháng thể 119-122 ở chuột nhắt, Ch119-122 và Hu119-122 với OX40 được kiểm tra trong thử nghiệm liên kết FACS với các tế bào L/OX40 gần như theo quy trình được cung cấp bởi Dr. Laura Bover. Các kháng thể liên kết với các tế bào L/OX40 được phát hiện bằng kháng thể IgG kháng chuột ở dê được gắn nhãn PE (đối với 119-122 ở chuột nhắt) hoặc kháng thể IgG kháng người ở dê được gắn nhãn PE (đối với Ch119-122 và Hu119-122).

Fig. 26 thể hiện kết quả của phân tích FACS. Đường cong chuẩn độ của Hu119-122 là tương tự với đường cong chuẩn độ của Ch119-122, gợi ý rằng ái lực liên kết kháng nguyên của 119-122 ở chuột nhắt được giữ lại trong Hu119-122. Tuy nhiên, các giá trị MCF ở các nồng độ kháng thể cao hơn của Ch109-122 và Hu119-122 không rơi đúng trên đường cong tương ứng. Sau khi điều chỉnh các điều kiện thử nghiệm, phân tích FACS được lặp lại.

Ví dụ III

Để đánh giá khả năng của các kháng thể kháng OX40 của người được làm giống người theo sáng chế để tăng cường sự tăng sinh tế bào T, các tác giả sáng chế đã tiến hành thử nghiệm sự tăng sinh sử dụng các tế bào CD32-L được phủ kháng CD3 và tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm mới được lựa chọn. Fig. 27 cho thấy

rằng dòng mAb kháng OX40 của người được làm giống người 119-122 (Hu122), và kháng thể đột biến liên kết FcR của nó (Hu122-AA) tăng cường sự tăng sinh tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm. Hu122 tạo ra hoạt tính kích thích tế bào T tốt hơn so với mAb kháng OX40 của người ở chuột nhắt bố mẹ (Chuột nhắt 122). (Fig. 27)

Dòng mAb kháng OX40 của người được làm giống người được đột biến liên kết FcR 106-222 (Hu222-AA) và dòng mAb kháng OX40 của người dạng khảm 106-222 (Ch222) tăng cường sự tăng sinh tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm được kích thích bởi kháng CD3. Các kháng thể này có hoạt tính kích thích tương tự so với mAb kháng OX40 của người ở chuột nhắt bố mẹ (Chuột nhắt 106-222). Tuy nhiên, Ab OX40 kháng người được làm giống người đầy đủ, Hu106, không tăng cường sự tăng sinh tế bào T. (Fig. 28)

Để đánh giá khả năng của các kháng thể kháng OX40 của người được làm giống người để phong bế chức năng kìm hãm tế bào T điều hòa CD4⁺ (Tregs), các tác giả sáng chế tiến hành thử nghiệm sự tăng sinh sử dụng tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm mới được lựa chọn và CD4⁺CD25^{cao}CD127^{thấp} Tregs. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng kháng thể khảm Ch122 và kháng thể được làm giống người được gây đột biến liên kết Fc (Hu122-AA) thể hiện công hiệu tốt hơn so với mAb kháng OX40 của người ở chuột nhắt bố mẹ (Chuột nhắt 122) trong việc phong bế chức năng kìm hãm Treg CD4⁺. (Fig. 29 A-B)

Trong thử nghiệm trên Fig. 27, tế bào T chưa qua thí nghiệm CD4⁺CD25^{thấp}CD127⁺CD45RO⁻CD45RA⁺ mới được lựa chọn được kích thích bằng các tế bào L biểu hiện CD32 (CD32-L) đã được phủ với 4 nồng độ của kháng thể kháng CD3 cộng với 2 µg/ml các kháng thể dòng Ab kháng OX40 của người 119 hoặc các kháng thể đối chứng. Ba ngày sau khi kích thích, chất đồng vị phóng xạ triti được bổ sung và được nuôi cấy trong 16-18 giờ bổ sung trước khi thu hoạch tế bào. Dữ liệu là đại diện của các thử nghiệm từ hai thể cho. Phối tử hOX40 biểu hiện tế bào CD32-L (CD32-L/hOX40L) dùng làm đối chứng dương, trong khi IgG1 của người và chuột nhắt dùng làm đối chứng âm tính.

Trong thử nghiệm trên Fig. 28, tế bào T CD4⁺ chưa qua thí nghiệm mới được lựa chọn được kích thích bằng tế bào CD32-L đã được phủ với 4 nồng độ của kháng

thể kháng CD3 cộng với 2 $\mu\text{g/ml}$ các kháng thể dòng mAb kháng OX40 của người 106-222 (Hu222) hoặc các kháng thể đối chứng. Ba ngày sau khi kích thích, chất đồng vị phóng xạ triti được bổ sung và được nuôi cấy trong 16-18 giờ bổ sung trước khi thu hoạch tế bào. Dữ liệu là đại diện của các thử nghiệm từ hai thể cho. CD32-L/hOX40L dùng làm đối chứng dương, trong khi IgG1 của người và chuột nhất dùng làm đối chứng âm tính.

Trong thử nghiệm trên Fig. 29, tế bào T chưa qua thí nghiệm CD4^+ mới được lựa chọn được nuôi cấy trong điều kiện có mặt $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{cao}}\text{CD127}^{\text{thấp}}\text{Tregs}$ ở ba tỷ lệ Tregs: T hiệu ứng và được kích thích bằng tế bào CD32-L đã được phủ với 0,2 $\mu\text{g/ml}$ kháng thể kháng CD3 cộng với 10 $\mu\text{g/ml}$ các kháng thể dòng mAb kháng OX40 của người 119-122 hoặc các kháng thể đối chứng. Ba ngày sau khi kích thích, chất đồng vị phóng xạ triti được bổ sung và được nuôi cấy trong 16-18 giờ bổ sung trước khi thu hoạch tế bào. Dữ liệu là đại diện của ba thử nghiệm. CD32-L/hOX40L dùng làm đối chứng dương, trong khi IgG1 của người và chuột nhất dùng làm đối chứng âm tính.

Ví dụ IV

Vì các kháng thể sẽ bắt gặp các tế bào đơn nhân máu ngoại vi tổng cộng (PBMCs) khi chúng được đưa cho bệnh nhân dùng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch, các tác giả sáng chế thử nghiệm khả năng của các kháng thể kháng OX40 của người theo sáng chế để kích thích sự tăng sinh tế bào T sử dụng PBMC làm tế bào trình kháng nguyên (APC) trong thử nghiệm sự tăng sinh. Tuy nhiên, các tác giả sáng chế thu được dữ liệu biến thiên cao với mAb kháng OX40 của người ở chuột nhất khi sử dụng PBMC làm APC mà không được thấy khi sử dụng các bạch cầu đơn nhân làm APC, gợi ý rằng các kháng thể theo sáng chế đòi hỏi một số loại liên kết ngang cho hoạt tính. Để thử nghiệm khả năng này, các đĩa được phủ với mAb kháng OX40 của người và kháng CD3, được rửa, và được sử dụng để kích thích sự tăng sinh tế bào T CD4^+ hoặc CD8^+ trong sự vắng mặt của các tế bào phụ thêm. Fig. 30 thể hiện kết quả rằng các kháng thể kháng OX40 của người tăng cường sự tăng sinh tế bào T CD4^+ và CD8^+ .

1×10^5 tế bào T chưa qua thí nghiệm $CD4^+CD25^{\text{thấp}}CD45RO^-CD45RA^+$ mới được lựa chọn (Fig. 30A) hoặc tế bào T $CD3^+CD8^+$ (Fig. 30B) được kích thích bằng kháng CD3 được liên kết đĩa (3 $\mu\text{g/ml}$) và mAb của chuột nhất kháng OX40 của người (2 $\mu\text{g/ml}$). Thymidin đã được triti hóa được bổ sung vào ngày nuôi cấy thứ ba và các tế bào được thu hoạch sau khi 15 giờ ủ khác. Sự tăng sinh của tế bào T được đánh giá bởi sự kết hợp thymidin. mAb kháng OX40 của người thu được từ ba sự dung hợp thể lai. Con số đứng sau số dung hợp biểu thị kháng thể đặc hiệu. IgG1 của chuột nhất và 119-42 được sử dụng làm đối chứng âm tính. Mỗi lần xử lý được thực hiện ba lần. Dữ liệu đại diện từ 4 thể cho tế bào T được thể hiện. (Fig. 30C). Cả ba phiên bản của mAb kháng OX40 của người được làm giống người [Hu106-222 và Hu119-122; Hu106-222AA và Hu119-122AA (AA biểu thị hai gốc liên kết Fc được đột biến thành axit amin alanin); và Ch119-122 (tương tự với 119-122 được làm giống người ngoại trừ rằng vùng thay đổi của chuột nhất “paratop” được duy trì)] đều kích thích sự tăng sinh tế bào T $CD4^+$ chưa qua thí nghiệm. Kháng CD28 được sử dụng làm đối chứng dương.

Như được thể hiện trên Fig. 30, panen A và B, thể hiện rằng mAb kháng OX40 của người ở chuột nhất liên kết đĩa kích thích hiệu quả sự tăng sinh của tế bào T $CD4^+$ chưa qua thí nghiệm và tế bào T $CD8^+$ khoảng 10 đến 40 lần. Các tác giả sáng chế mở rộng nghiên cứu đến mAb kháng OX40 của người được làm giống người và phát hiện thấy rằng ba phiên bản của các kháng thể được làm giống người, dù là được làm giống người hoàn toàn, khả năng có thể đột biến AA trong đó các gốc chịu trách nhiệm đối với liên kết với thụ thể Fc được biến đổi thành alanin, là các chất kích thích hiệu nghiệm của sự tăng sinh tế bào T $CD4^+$ chưa qua thí nghiệm (Fig. 30C).

Fig. 31 thể hiện các kháng thể kháng OX40 của người được làm giống người và ở chuột nhất đòi hỏi sự liên kết ngang để tăng cường sự tăng sinh tế bào T. Tế bào T $CD4^+$ chưa qua thí nghiệm mới được lựa chọn được kích thích bằng kháng CD3 liên kết đĩa (3 $\mu\text{g/ml}$) cộng với mAb kháng OX40 của người được làm giống người liên kết đĩa hoặc tan (2 $\mu\text{g/ml}$) trong sự vắng mặt của các tế bào phụ thêm. Thymidin đã được triti hóa được bổ sung vào ngày nuôi cấy thứ ba và các tế bào được thu hoạch sau 15 giờ ủ khác. Sự tăng sinh của tế bào T được đánh giá bởi sự

kết hợp thymidin. IgG1 của chuột nhắt và kháng CD28 được sử dụng làm đối chứng âm tính và đối chứng dương, một cách tương ứng. Dữ liệu đại diện từ hai thể cho được thể hiện. Tế bào T $CD4^+$ chưa qua thí nghiệm được kích thích bằng kháng CD3 liên kết đĩa trong sự vắng mặt của các tế bào phụ thêm. Ngày tiếp theo, mAb kháng OX40 của người 119-122 (2 $\mu\text{g/ml}$) được bổ sung một mình hoặc kết hợp với lượng bằng như vậy của kháng thể thứ cấp kháng Fc. Sự tăng sinh tế bào được đánh giá như được mô tả trong panen A.

Công hiệu của mAb kháng OX40 của người được làm giống người Hu106-222 và Hu119-122 là có thể so sánh được với công hiệu của kháng CD28. Trái lại, khi kháng thể kháng OX40 của người dạng hòa tan được bổ sung vào dịch nuôi cấy tế bào T, tác dụng kích thích bị triệt tiêu. (Fig. 31A). Tuy nhiên, khi mAb kháng OX40 của người dạng hòa tan 119-122 được bổ sung cùng với IgG kháng chuột ở dê mảnh $F(ab')_2$, kháng thể thứ cấp đặc hiệu mảnh Fc, tác dụng kích thích được khôi phục (Fig. 31B). Các kết quả này chứng tỏ rằng mAb kháng OX40 của người đòi hỏi sự liên kết ngang cho hoạt tính sinh học của chúng.

Để đánh giá khả năng của mAb kháng OX40 của người, có tính chủ vận để phong bế chức năng kìm hãm của $CD4^+CD25^{\text{cao}}CD127^{\text{thấp}}nTregs$, các tác giả sáng chế tiến hành thử nghiệm sự tăng sinh trong điều kiện có mặt các tế bào T hiệu ứng $CD4^+CD25^{\text{thấp}}CD127^{\text{thấp}}CD45RO^+$ (Teff) và $CD4^+nTregs$. Bằng cách sử dụng hệ liên kết đĩa trong đó mAb kháng OX40 của người cùng với kháng CD3 được phủ trên đĩa và trong sự vắng mặt của các tế bào phụ thêm, mười hai (222, 132, 8B, 33A, 43, 58B, 122, 157A, 173B, 220C, 140A, 270) trong số các mAb của chuột nhắt kháng OX40 của người ức chế hiệu quả sự ức chế nTreg (Các Fig. 32A và 32B). Mặc dù tỷ lệ của nTregs so với tế bào T hiệu ứng được sử dụng trong các thử nghiệm này là 1:1, các kháng thể này có khả năng kích thích Các tế bào T hiệu ứng để tăng sinh lớn hơn từ 10 đến 35 % tỷ lệ phần trăm đạt được bởi các tế bào T hiệu ứng trong sự vắng mặt của nTregs. mAb kháng OX40 của người được làm giống người cũng đảo ngược chức năng kìm hãm của nTregs ở các mức tương tự (Fig. 32C). Các kết quả này cùng nhau cho thấy rằng mAb của chuột nhắt kháng OX40 của người là các chất kích thích hiệu nghiệm của OX40, dẫn đến sự tăng cường đáng kể sự tăng sinh tế bào T và sự ức chế chức năng kìm hãm nTreg. Ngoài ra, r

mAb kháng OX40 của người được làm giống người duy trì được hoạt tính sinh học hiệu quả của các kháng thể ở chuột nhắt bố mẹ của chúng.

Fig. 32 thể hiện mAb kháng OX20 của người phong bế hoạt tính của $CD4^+Foxp3^+nTregs$. Các tế bào T hiệu ứng $CD4^+CD25^-CD45RO^+$ được gắn nhãn CFSE và $CD4^+Foxp3^+$ Tregs thu được từ cùng thể cho khỏe mạnh. Tế bào T được kích thích bằng kháng CD28 hòa tan ($0,5 \mu g/ml$) và kháng CD3 liên kết đĩa ($3 \mu g/ml$) và mAb kháng OX40 của người ($2 \mu g/ml$). Sự tăng sinh của các tế bào T hiệu ứng được đánh giá bằng bào kế chảy đối với sự pha loãng CFSE. Tỷ lệ của nTregs so với các tế bào T hiệu ứng là 1:1. IgG1 của chuột nhắt được sử dụng làm đối chứng âm tính. Tế bào T $CD4^+$ chưa qua thí nghiệm được sử dụng làm tế bào T đối chứng để chứng tỏ sự ức chế đặc hiệu sự tăng sinh tế bào T hiệu ứng bởi nTregs. Fig. 32A là dữ liệu FACS đại diện thể hiện sự tăng sinh của các tế bào T hiệu ứng trong điều kiện có mặt tế bào T $CD4^+$ chưa qua thí nghiệm, nTregs hoặc nTregs cộng với mAb kháng OX40 của người 119-33A. Fig. 32B thể hiện tỷ lệ phần trăm của sự tăng sinh tế bào T hiệu ứng trong điều kiện có mặt nTregs sau khi xử lý bằng mAb kháng OX40 của người ở chuột nhắt (20 được thử nghiệm). Fig. 32C thể hiện tất cả ba phiên bản của mAb kháng OX40 của người được làm giống người phục hồi sự tăng sinh của các tế bào T hiệu ứng.

Báo cáo gần đây gợi ý rằng sự khởi phát OX40 có thể gây ra hiện tượng gây chết tế bào theo chương trình của dòng tế bào T ở người biểu hiện OX40 (Yoshiaki Takahashi et al., 200B, Aids Research and human Retroviruses,24). Các tác giả sáng chế do vậy thử nghiệm ảnh hưởng của các nồng độ tăng dần của mAb kháng OX40 của người 106-222 cộng với liều thấp, cố định của kháng CD3 đến sự sống sót của ba tập hợp con tế bào T trong điều kiện có mặt các bạch cầu đơn nhân. Fig. 33A thể hiện rằng nồng độ cao của mAb kháng OX40 của người 106-222 ($20-30 \mu g/ml$) ưu tiên tiêu diệt $Foxp3^+$ nTregs đã được hoạt hóa trong khi các tế bào T $CD4^+$ chưa qua thí nghiệm được hoạt hóa và tế bào $CD4^+$ T ghi nhớ là kháng hoặc ít mẫn cảm hơn với nỗ lực này. Để thử nghiệm xem mAb kháng OX40 của người có tác động trực tiếp trên Tregs để gây ra sự chết tế bào hay không, các tác giả sáng chế tiến hành các thử nghiệm mới trong sự vắng mặt của các tế bào phụ thêm. Fig. 33B thể hiện rằng việc truyền tín hiệu OX40 mạnh ở dạng hỗn hợp với kháng CD3

cụ thể tiêu diệt nTregs trong sự vắng mặt của các tế bào phụ thêm. Để xác nhận xem tác dụng tiêu diệt được điều tiết bởi mAb kháng OX40 của người có bất chức sự khởi phát OX40 bởi phối tử OX40 tự nhiên hay không, các tác giả sáng chế sử dụng dòng tế bào L nguyên bào sợi ở chuột nhắt mà biểu hiện quá mức hOX40L và sử dụng nó để kích thích nTregs trong điều kiện có mặt liều lượng thấp của kháng CD3 và thu được tác dụng tiêu diệt tương tự trên nTregs (Fig. 33C). Các kết quả này cho thấy rằng sự khởi phát OX40 mạnh tiêu diệt các tế bào Tregs biểu hiện OX40.

Cụ thể, Fig. 33 thể hiện nồng độ cao của mAb kháng OX40 của người ưu tiên tiêu diệt Foxp3⁺ Tregs. Trên Fig. 33A, mỗi tập hợp con tế bào T (chưa qua thí nghiệm, CD4⁺CD25^{thấp}CD127⁺CD45RO⁻CD45RA⁺; ghi nhớ, CD4⁺CD25^{thấp}CD127⁺CD45RA⁻CD45RO⁺; và nTregs, CD4⁺CD25^{cao}CD127^{thấp}) được nuôi cấy với tỷ lệ ngang bằng của các bạch cầu đơn nhân CD14⁺ trong điều kiện có mặt kháng CD3 hòa tan (0,3 µg/ml) và nồng độ tăng dần của mAb kháng OX40 của người ở chuột nhắt 106-222. Khả năng sống sót của tế bào được xác định sau 3 ngày nuôi cấy bằng phân tích bào kế chảy, cho qua cửa trên các tế bào lympho sống sót. Dữ liệu từ hai thể cho tế bào T được thể hiện. Các Fig. 33B và 33C thể hiện sự khởi phát mạnh của OX40 tiêu diệt CD4⁺Foxp3⁺ Tregs. Fig. 33B thể hiện rằng CD4⁺Foxp3⁺ Tregs được kích thích bằng kháng CD3 liên kết đĩa (2 µg/ml) cộng với mAb 119-122 hòa tan (30 µg cho mỗi triệu tế bào) hoặc kháng thể đối chứng IgG1 của chuột nhắt. Các tế bào sống âm tính với trypan xanh da trời sau một ngày nuôi cấy được đếm bằng hồng cầu kế. Fig. 33C thể hiện rằng CD4⁺Foxp3⁺ Tregs được kích thích bằng kháng CD3 hòa tan (0,2 µg/ml) cộng với các tế bào L hoặc các tế bào L biểu hiện phối tử hOX40 (L/hOX40L). Các tế bào sống được đếm sau một ngày kích thích.

Các tác giả sáng chế tiếp theo tìm kiếm nhằm xác định xem mAb kháng OX40 của người có tác động trực tiếp trên các tế bào T để phong bế chức năng kìm hãm nTreg hay không. Các tế bào T hiệu ứng CD4⁺ mới được lựa chọn hoặc nTregs được hoạt hoá trước qua đêm với kháng CD3 và sau đó được tạo xung với mAb kháng OX40 của người trong 4 giờ. Các tế bào T hiệu ứng sau đó được rửa, được gắn nhãn với CFSE, và được đồng nuôi cấy với nTregs trong điều kiện có mặt số lượng ngang bằng của các bạch cầu đơn nhân CD14⁺ và kháng CD3. Tương tự,

nTregs đã được kích thích trước được rửa và được nuôi cấy với các tế bào T hiệu ứng được gắn nhãn CFSE chưa được xử lý.

Fig. 34 thể hiện mAb kháng OX40 của người tác động trực tiếp trên tế bào T để phong bế chức năng kìm hãm của Tregs. Fig. 34A thể hiện mAb kháng OX40 của người tác động trực tiếp trên tế bào T ghi nhớ hiệu ứng để trao cho chúng khả năng kháng với sự ức chế bởi nTregs. Tế bào T ghi nhớ $CD4^+CD25^{thấp}CD127^+CD45RA^-CD45RO^+$ được kích thích bằng kháng CD3 liên kết đĩa ($0,8 \mu\text{g/ml}$) ở môi trường nuôi cấy (RPMI/10% FCS/ P/S cộng với IL-2 ở 30 IU/ml) trong 12 giờ, sau đó được tạo xung với mAb kháng OX40 của người (119-122, $22 \mu\text{g}$ cho mỗi $0,5$ triệu tế bào) ở môi trường nuôi cấy trong 4 giờ, rửa 3 lần, và 8×10^4 tế bào T hiệu ứng được gắn nhãn CFSE được nuôi cấy với tỷ lệ giảm dần của nTregs. Sự tăng sinh của tế bào T hiệu ứng được đánh giá bằng bào kế chảy đối với sự pha loãng CFSE. mAb kháng OX40 của người tác động trên Tregs làm cho chúng không thể ức chế sự tăng sinh tế bào T hiệu ứng (Fig. 34B). $CD4^+CD25^{cao}CD127^{thấp}$ nTregs được kích thích trước bằng kháng CD3 liên kết đĩa ($2 \mu\text{g/ml}$) ở môi trường nuôi cấy trong 12 giờ, sau đó được tạo xung với mAb kháng OX40 của người, 119-122 hoặc 106-222, hoặc kháng thể đối chứng, kháng ICOS hoặc IgG1 của chuột nhắt, như được mô tả trong panen A, được rửa và được nuôi cấy với các tế bào ghi nhớ T hiệu ứng được gắn nhãn CFSE. Sự tăng sinh của các tế bào T hiệu ứng được đánh giá bằng bào kế chảy đối với sự pha loãng CFSE.

Các tế bào T hiệu ứng đã được điều trị bằng mAb kháng OX40 của người trở nên kháng với sự ức chế bởi các tế bào nTreg. (Fig. 34A) Trái lại, sự tăng sinh của các tế bào T hiệu ứng đã được điều trị bằng kháng thể đối chứng IgG1 của chuột nhắt vẫn còn mẫn cảm với sự ức chế bởi nTregs. Fig. 34B thể hiện rằng nTregs được điều trị bằng mAb kháng OX40 của người không thể ức chế sự tăng sinh của các tế bào T hiệu ứng. Trái lại, nTregs đã được điều trị bằng các kháng thể đối chứng, như kháng ICOS hoặc IgG1 của chuột nhắt, vẫn còn có tính ức chế. Các kết quả này cho thấy rằng mAb kháng OX40 của người theo sáng chế tác động trực tiếp đến cả tế bào T hiệu ứng và nTregs để phục hồi sự tăng sinh tế bào T hiệu ứng.

Ví dụ V

Dữ liệu *in vivo* sơ bộ bổ sung chứng tỏ rằng kháng thể kháng OX40 của người tác động ở chuột nhắt làm tăng cường sự phát triển tế bào T và sự đào thải khối u ở chuột nhắt. Trước đây cho thấy rằng mAb kháng OX40 của người có thể hoạt hóa một cách đặc hiệu thác NF- κ B ở tế bào T CD8⁺ ở chuột nhắt được tải nạp với OX40 của người. Để xác định xem mAb kháng hOX40 có thể tăng cường sự đào thải khối u bằng cách kích thích sự sống sót tế bào T CD8⁺ hiệu ứng và sự phát triển dòng vô tính *in vivo*, tế bào T CD8⁺ Pmel chuyển gen được tải nạp với gen luxiferaza và hOX40 được chuyển một cách thích hợp vào chuột nhắt bị bạch tạng C57BL/6 mang khối u MC38 không được nhuộm màu. Sau khi chuyển thích hợp tế bào T đã được tải nạp, chuột nhắt được điều trị bằng Ab. Đã phát hiện thấy rằng đáng kể hơn tế bào T Pmel OX40 của người⁺ luxiferaza⁺ di trú nhiều hơn một cách đáng kể vào phổi vào ngày 4 ở chuột nhắt đã được điều trị bằng mAb kháng hOX40 so với chuột nhắt đã được điều trị bằng kháng thể đối chứng IgG1 (Fig. 35B), thể hiện rằng sự khởi phát hOX40 ở chuột nhắt thúc đẩy sự phát triển tế bào T CD8⁺. Vào ngày 8 (số liệu không được thể hiện) và ngày 12 sau khi điều trị, đã phát hiện thấy rằng cùng nhóm chuột nhắt được điều trị bằng mAb kháng hOX40 giữ lại tế bào T luxiferaza⁺Pmel nhiều hơn một cách đáng kể ở vị trí khối u so với nhóm đối chứng gồm chuột nhắt đã được điều trị bằng IgG1 (Fig. 35B), lại cho thấy rằng sự khởi phát hOX40 ở chuột nhắt thúc đẩy sự sống sót của tế bào CD8⁺. Cuối cùng, kích thước khối u của chuột nhắt nhận tế bào T CD8⁺ hOX40⁺Pmel và sau đó được điều trị bằng mAb kháng hOX40 là nhỏ hơn một cách đáng kể so với ở chuột nhắt nhận tế bào T Pmel không được tải nạp và được điều trị bằng mAb kháng hOX40 hoặc tế bào T hOX40⁺Pmel sau đó là điều trị bằng kháng thể phù hợp-IgG1 ở chuột nhắt đối chứng. Các kết quả này thể hiện rằng sự khởi phát OX40 của người ở chuột nhắt tạo ra tác dụng sinh học tương tự với tác dụng sinh học của OX40 của chuột nhắt (Gough MJ et, 2008). Do vậy, dữ liệu chứng tỏ khả năng của mAb kháng OX40 của người để kích thích sự phát triển và sự sống sót của tế bào CD⁺T *in vivo* và tăng cường sự đào thải khối u.

mAb kháng OX40 của người thúc đẩy sự phát triển và sự sống sót của tế bào T *in vivo*.

Chế độ vacxin trị liệu được thể hiện trên Fig. 35A. Chuột nhắt bị bạch tạng C57BL/6 trong các nhóm 5 được cấy dưới da (S.C) với 5×10^5 tế bào khối u MC38/gp100 không được nhuộm màu (ngày 0). Vào ngày 6, sự giảm lymphô bào được kích thích bằng cách sử dụng liều chiếu xạ 350 cGy. Vào ngày 7, 1×10^6 tế bào T Pmel-1 được truyền luxiferaza có hoặc không có sự biểu hiện OX40 của người được chuyển vào chuột nhắt mang khối u ($n = 5$ cho mỗi nhóm), sau đó là tiêm trong tĩnh mạch 5×10^5 DC được tạo xung peptit Gp100. IL-2 tái tổ hợp ở người được dùng trong màng bụng trong 3 ngày sau khi truyền tế bào T. Các kháng thể được sử dụng vào ngày 7, 9 và 11 với 100, 50 đến 50 μg , một cách tương ứng, cho mỗi lần tiêm cho mỗi chuột nhắt (Fig. 35B). Hình ảnh phát quang sinh học *in vivo* cho thấy sự tích tụ tế bào T pmel-1 CD8^+ biểu hiện luxiferaza trong phổi và các vị trí khối u vào ngày 4 và 12. Hai trong số năm chuột nhắt cho mỗi nhóm vào ngày 4 và ngày 12 được thể hiện (Fig. 35C). Khối u đáp ứng với điều trị sử dụng mAb kháng hOX40. Kích thước khối u được xác định 3 ngày một lần. Pmel-1 và Pmel-1 cộng với IgG1 của chuột nhắt được sử dụng làm đối chứng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với OX40 của người bao gồm: (a) vùng thay đổi chuỗi nặng CDR1 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13; (b) vùng thay đổi chuỗi nặng CDR2 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14; (c) vùng thay đổi chuỗi nặng CDR3 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15; (d) vùng thay đổi chuỗi nhẹ CDR1 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19; (e) vùng thay đổi chuỗi nhẹ CDR2 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20; và (f) vùng thay đổi chuỗi nhẹ CDR3 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21.
2. Kháng thể được phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm 1, trong đó kháng thể được phân lập này chứa vùng thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự có độ tương đồng ít nhất là 90% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 và vùng thay đổi chuỗi nặng có trình tự có độ tương đồng ít nhất là 90% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16.
3. Kháng thể được phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể được phân lập này là kháng thể đơn dòng.
4. Kháng thể được phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể được phân lập này là kháng thể được làm cho giống của người.
5. Kháng thể được phân lập, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm 4, mà có chứa vùng thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự có độ tương đồng ít nhất là 90% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và vùng thay đổi chuỗi nặng có trình tự có độ tương đồng ít nhất là 90% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17.
6. Axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.
7. Tế bào chủ chứa axit nucleic mã hóa kháng thể, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.

8. Phương pháp sản xuất kháng thể, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 7, tốt hơn là phương pháp này còn bao gồm bước thu lấy kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó từ tế bào chủ.

+

1/50

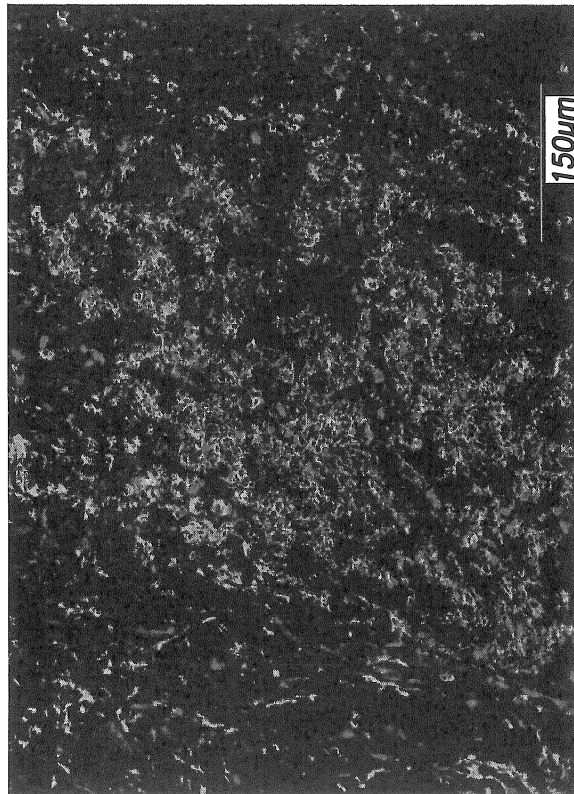
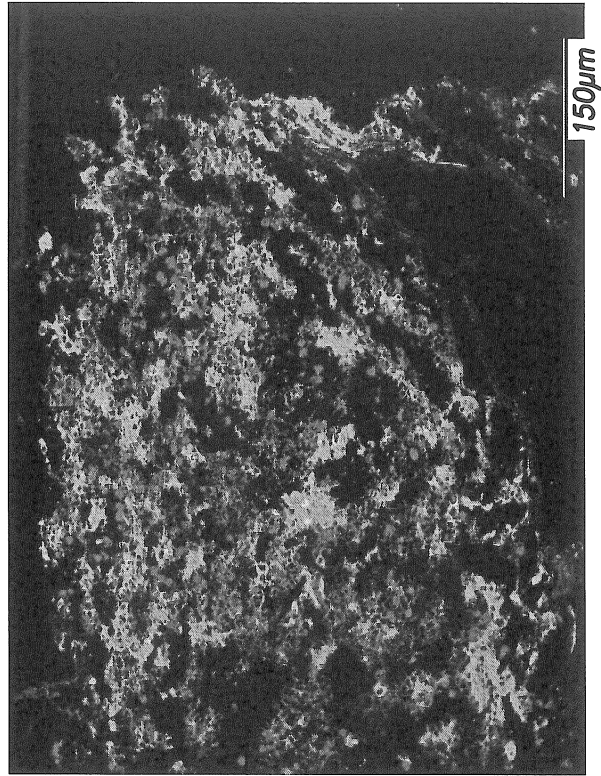
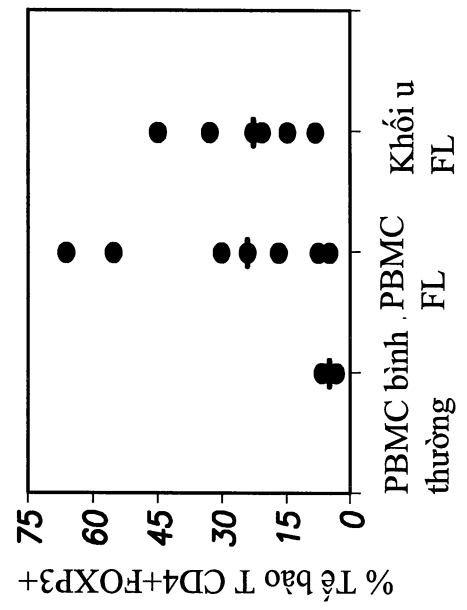
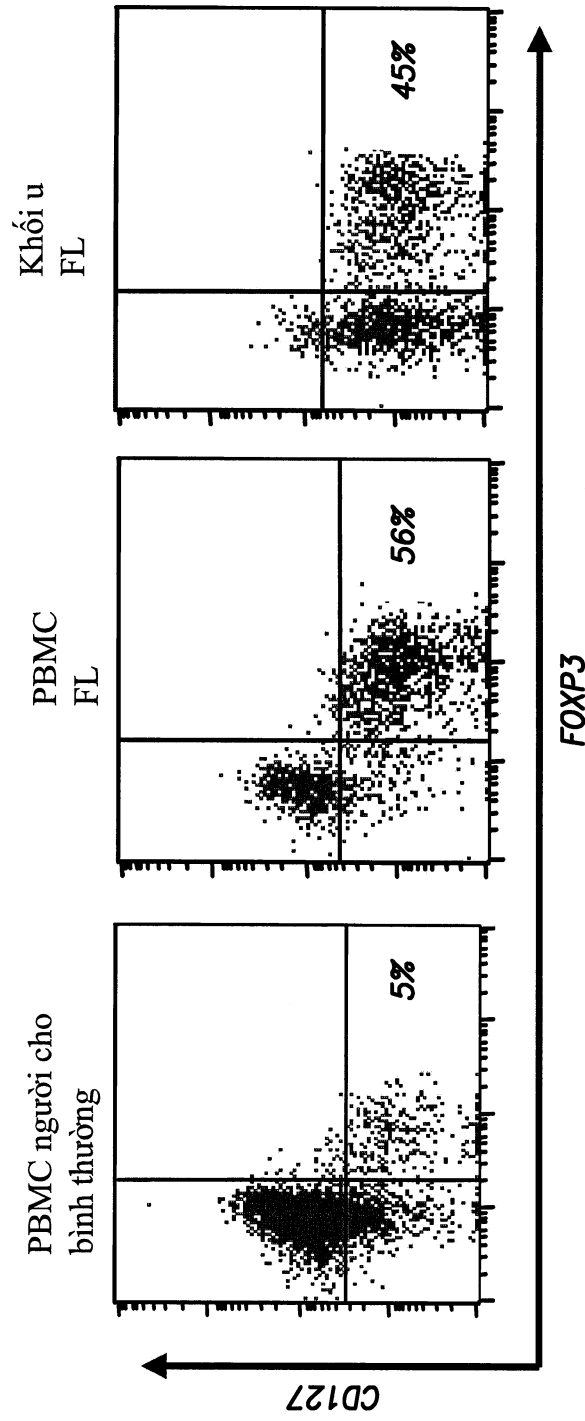


FIG. 1

+



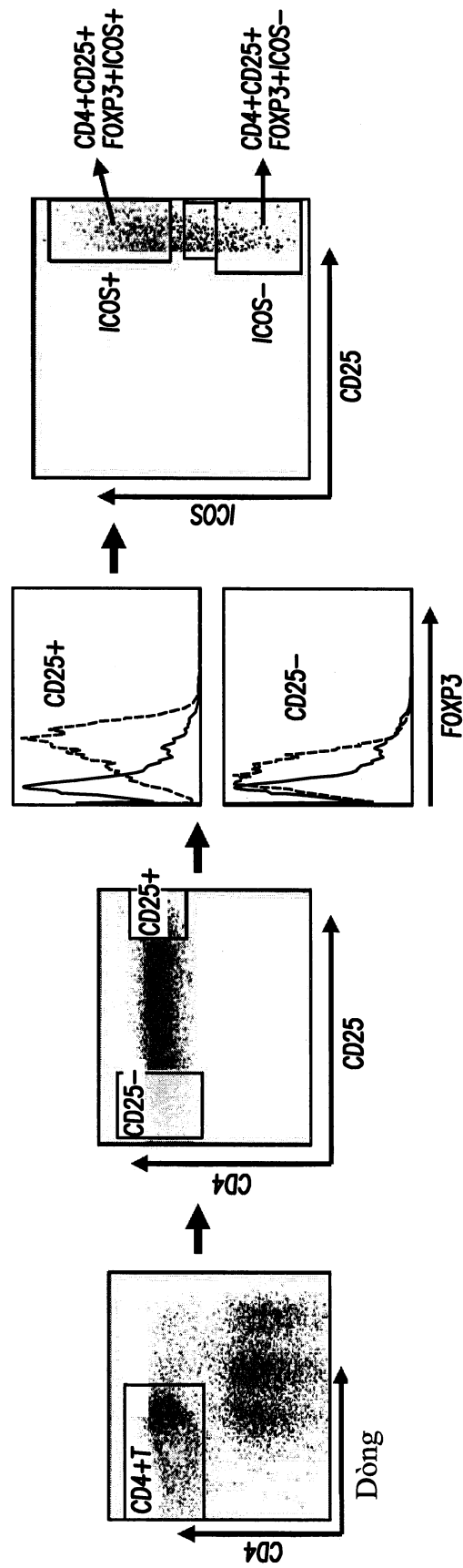


FIG.3

+

4/50

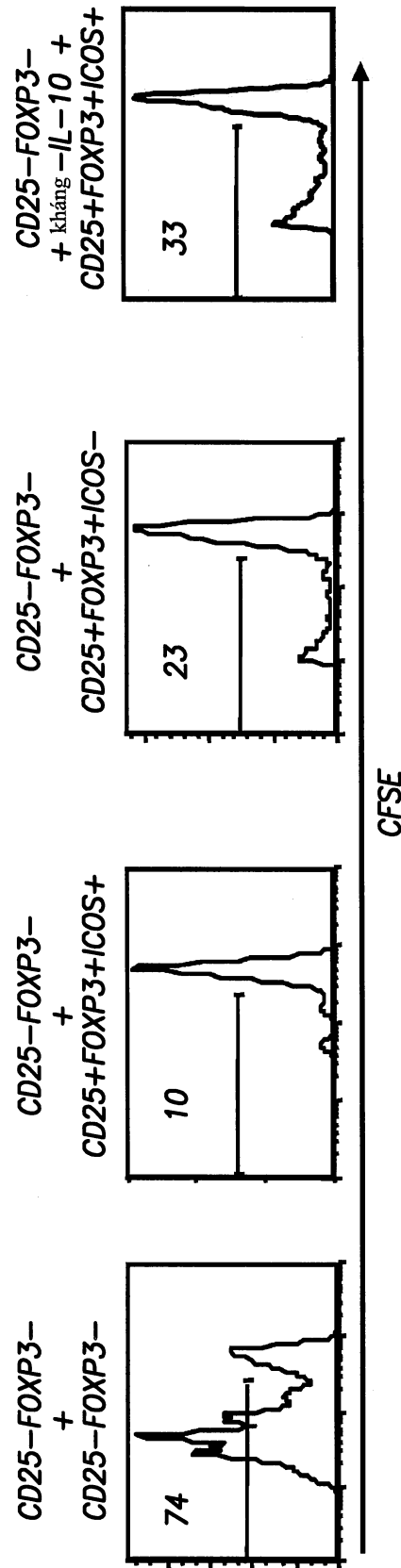


FIG.4

+

+

5/50

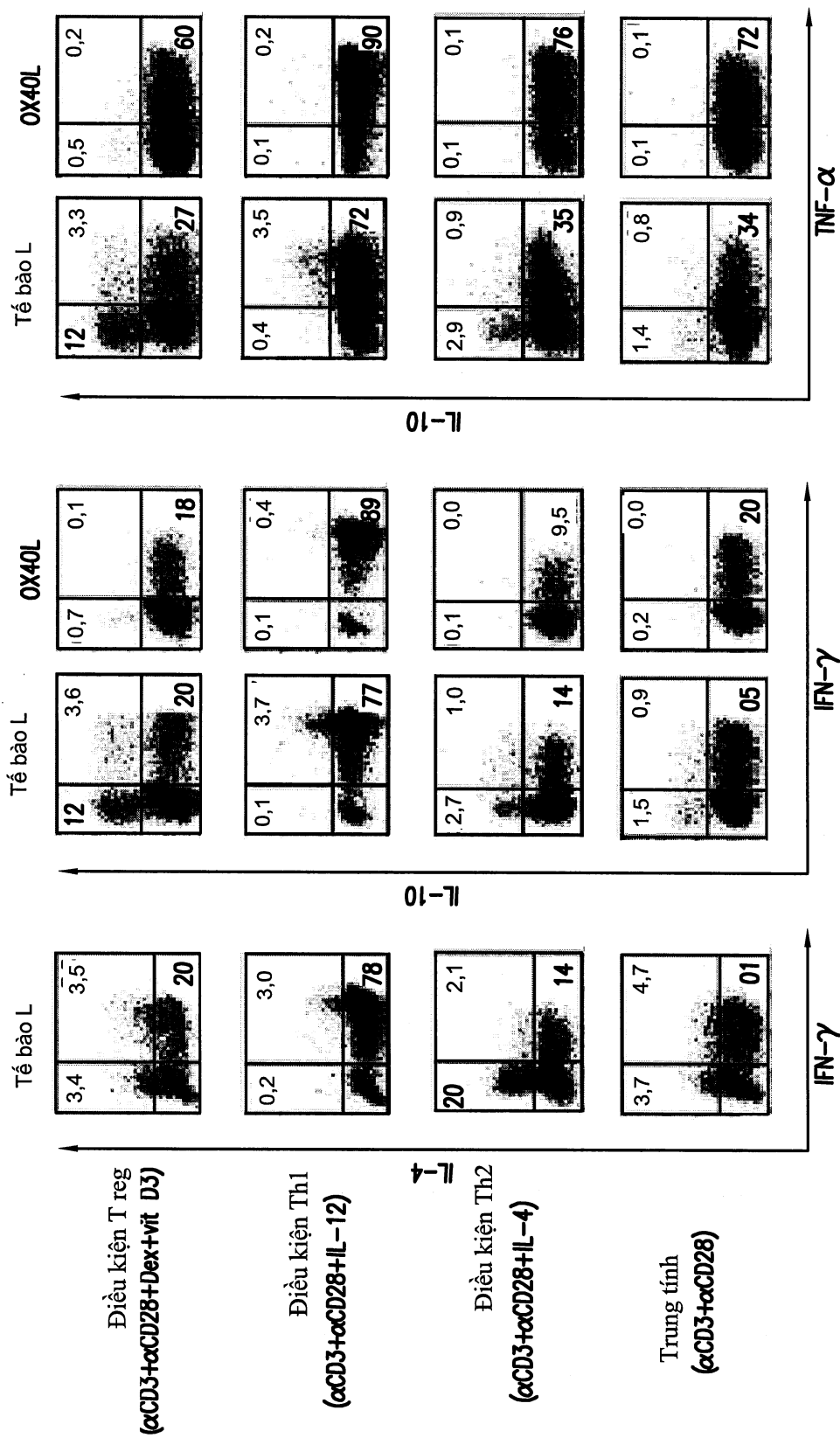


FIG.5A

+

+

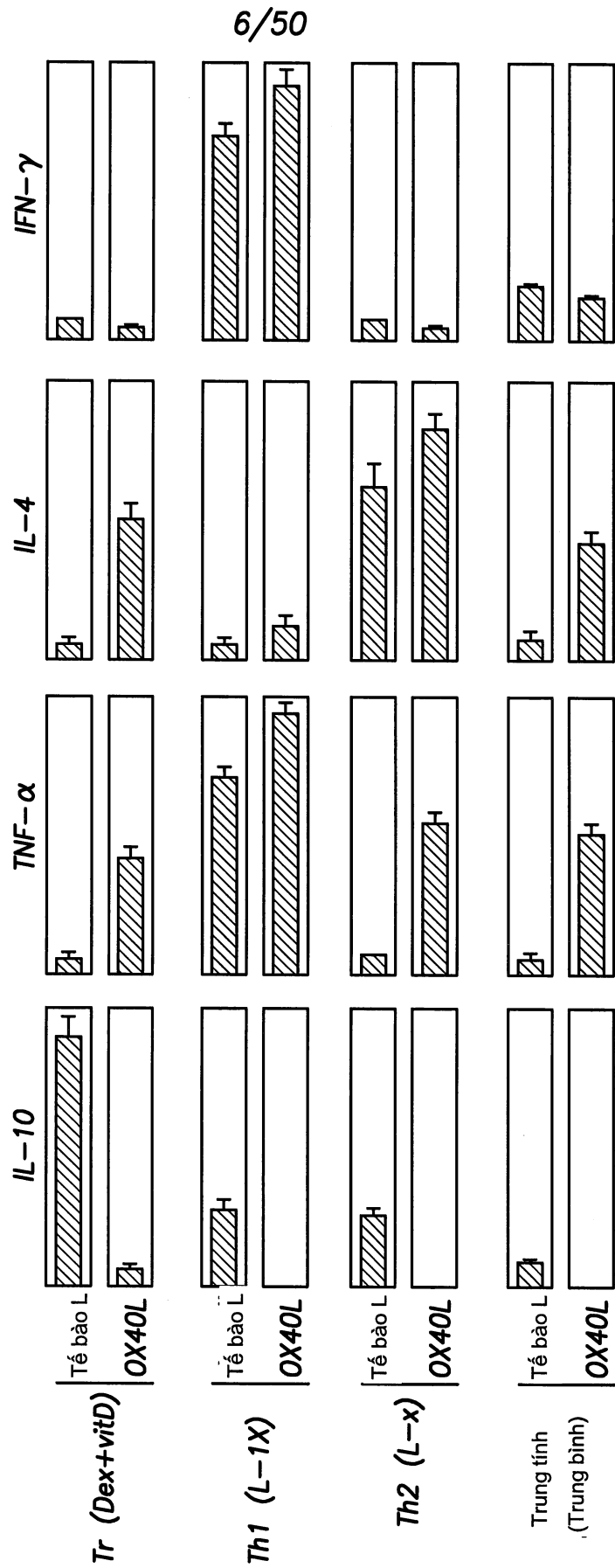


FIG.5B

+

+

7/50

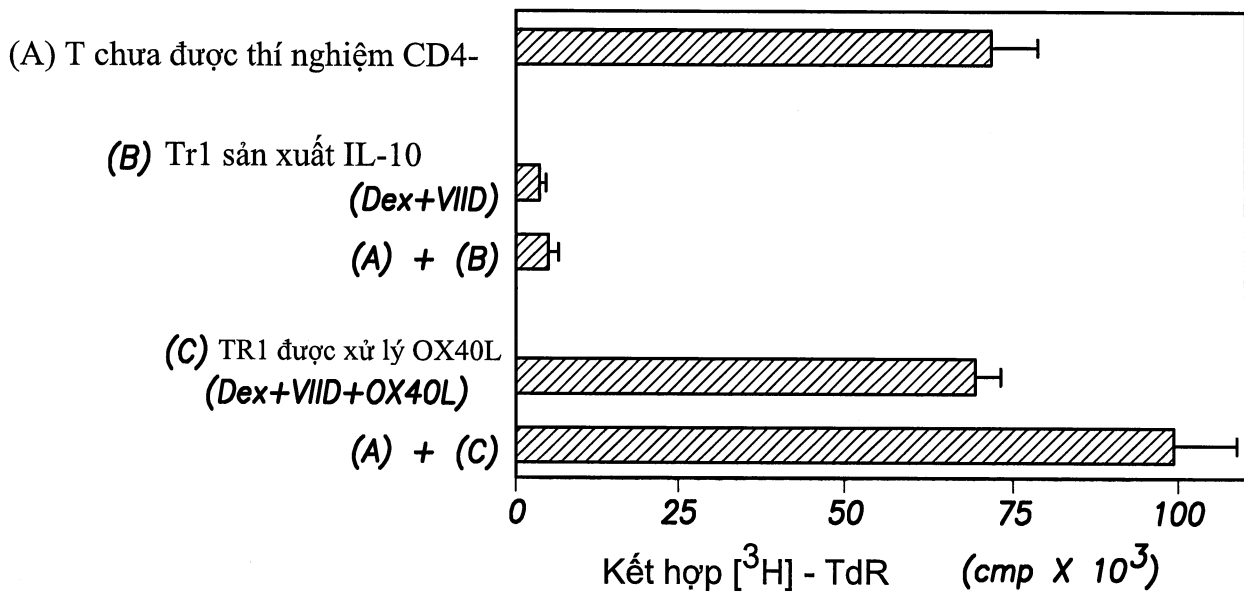


FIG.5C

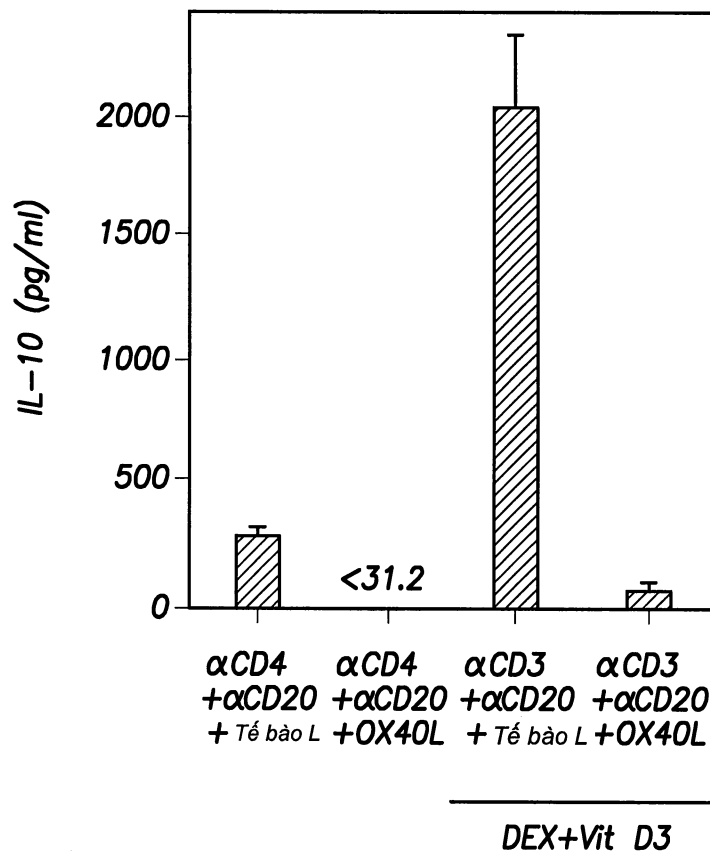
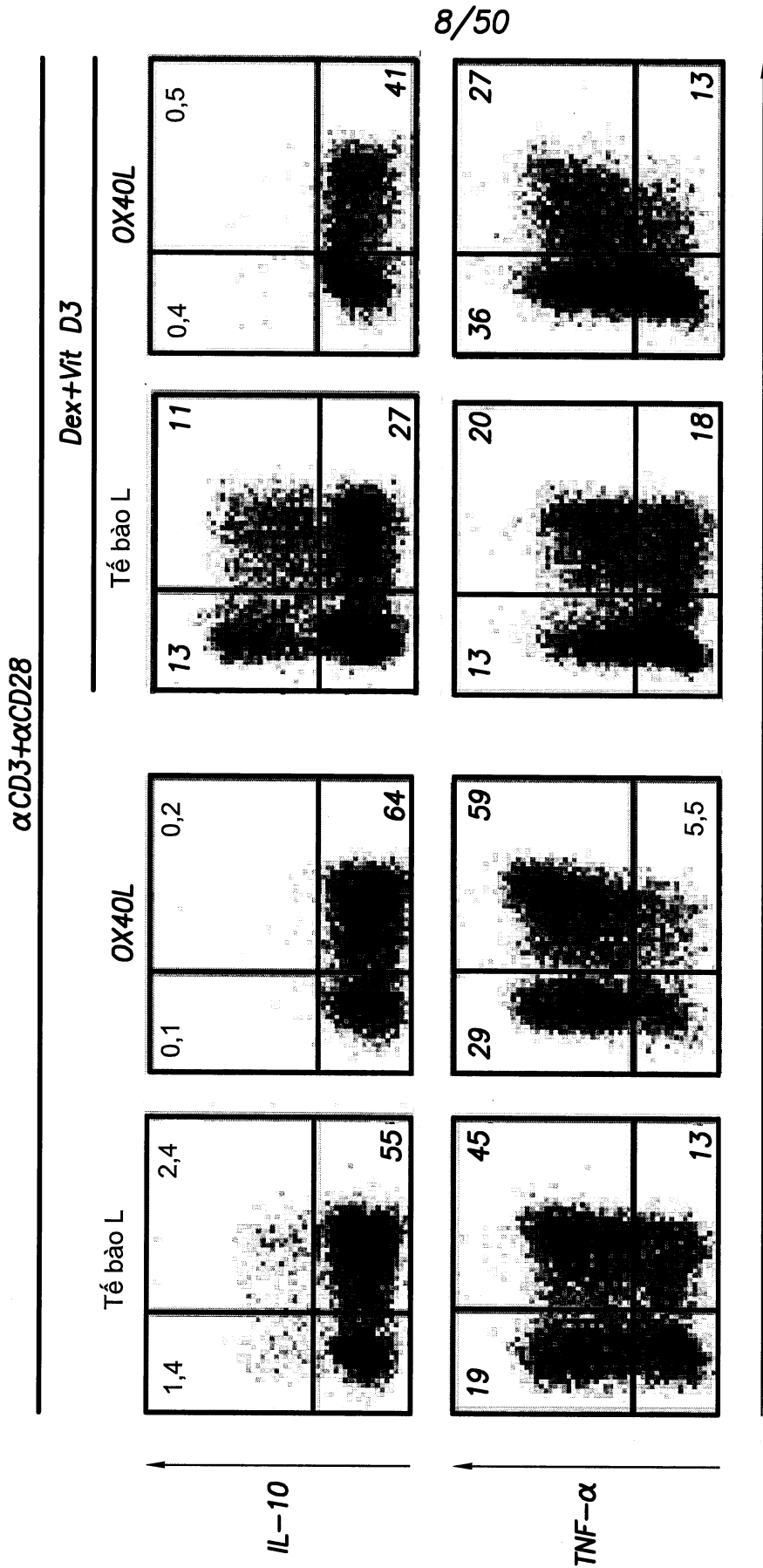


FIG.6B

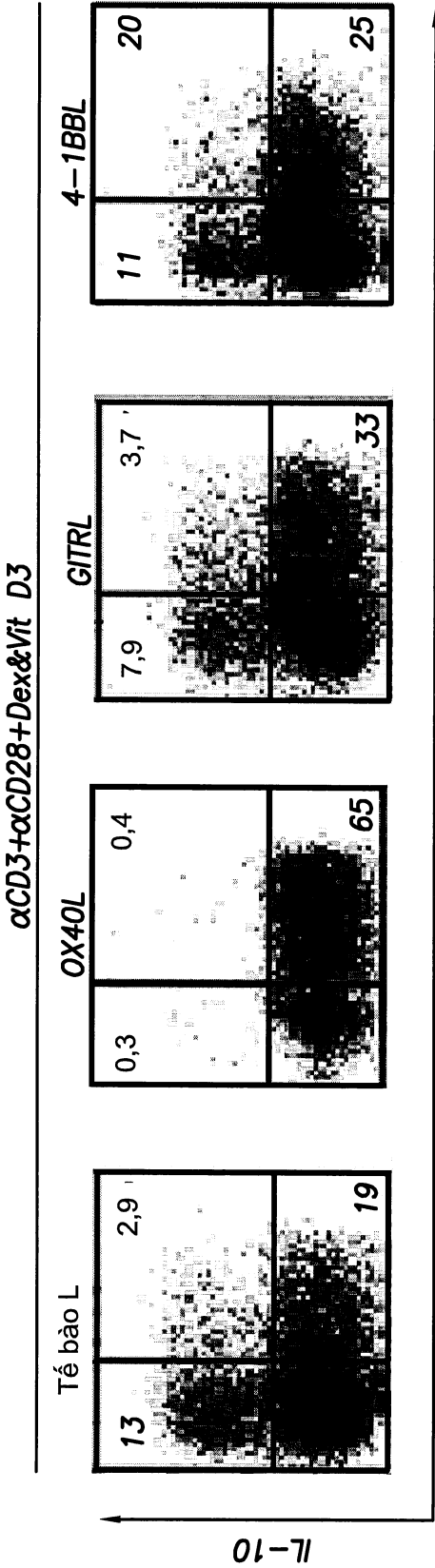
+

+



+

+



TNF- α
FIG.7A

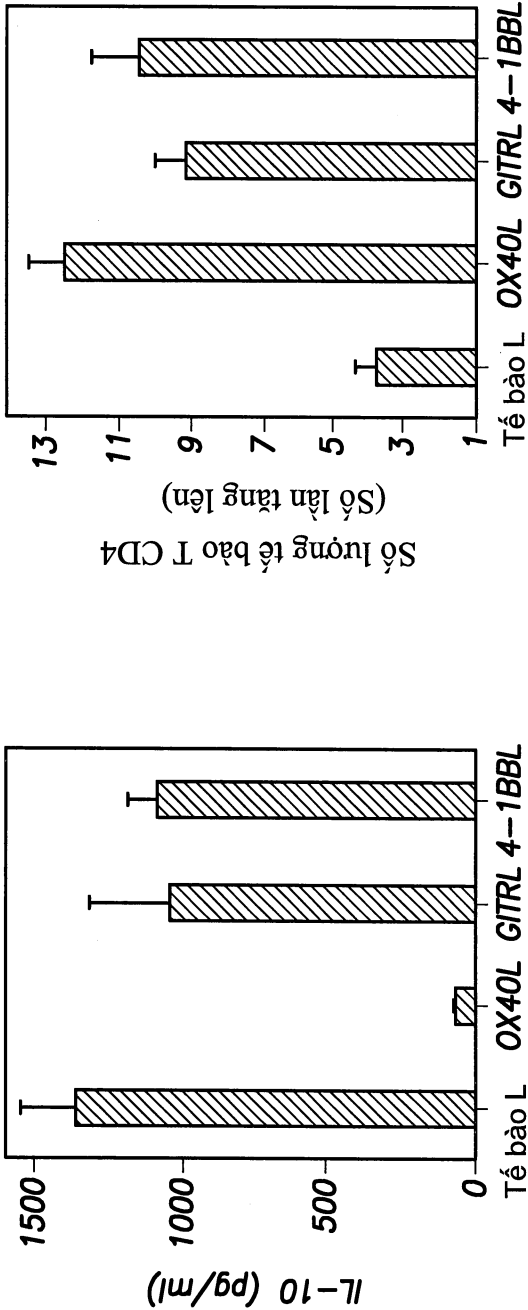


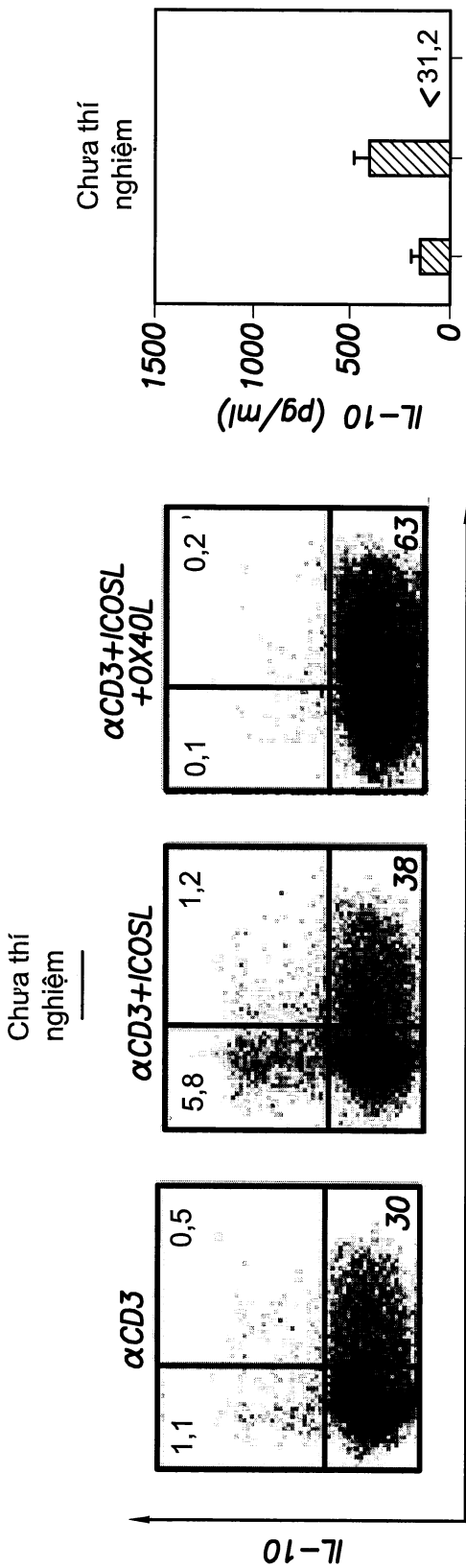
FIG.7B

FIG.7C

+

+

10/50



TNF- α
FIG. 8A

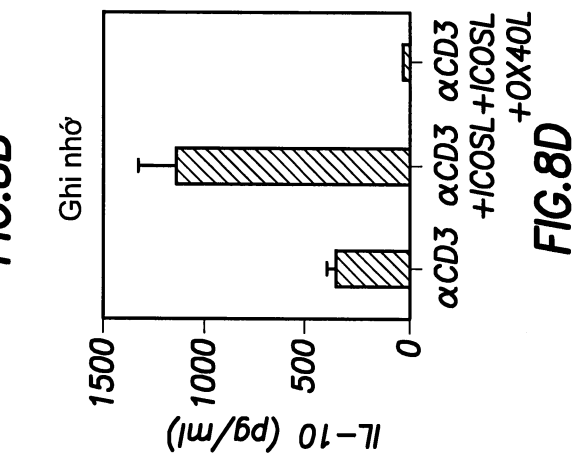
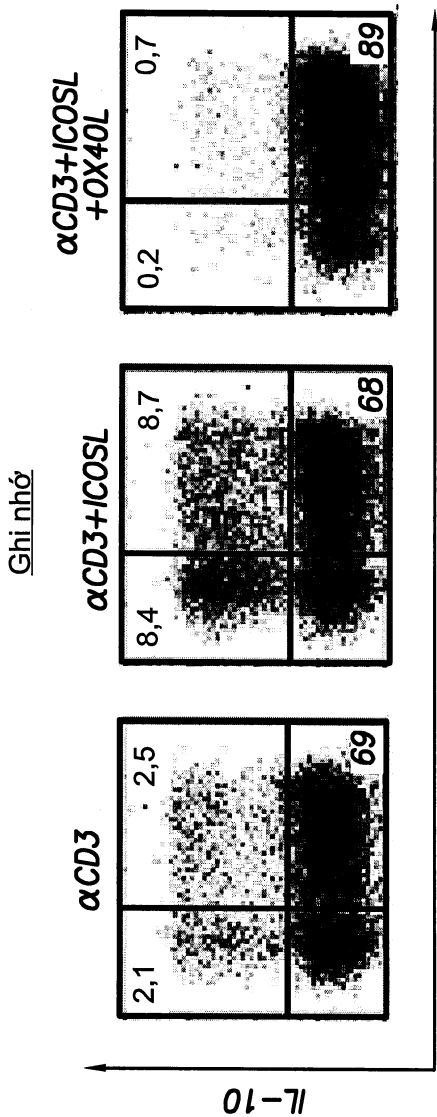


FIG. 8B



TNF- α
FIG. 8C

FIG. 8D

+

+

11/50

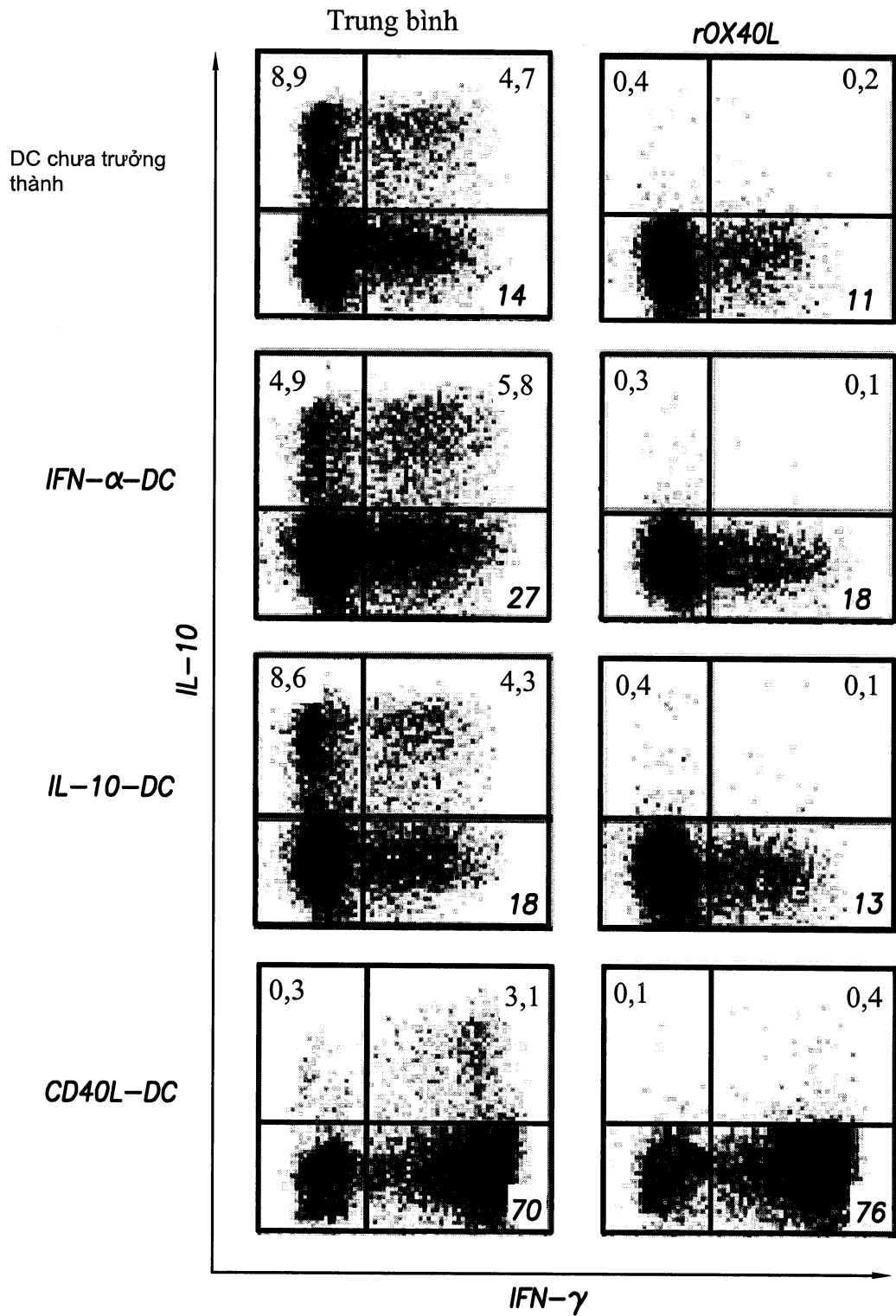
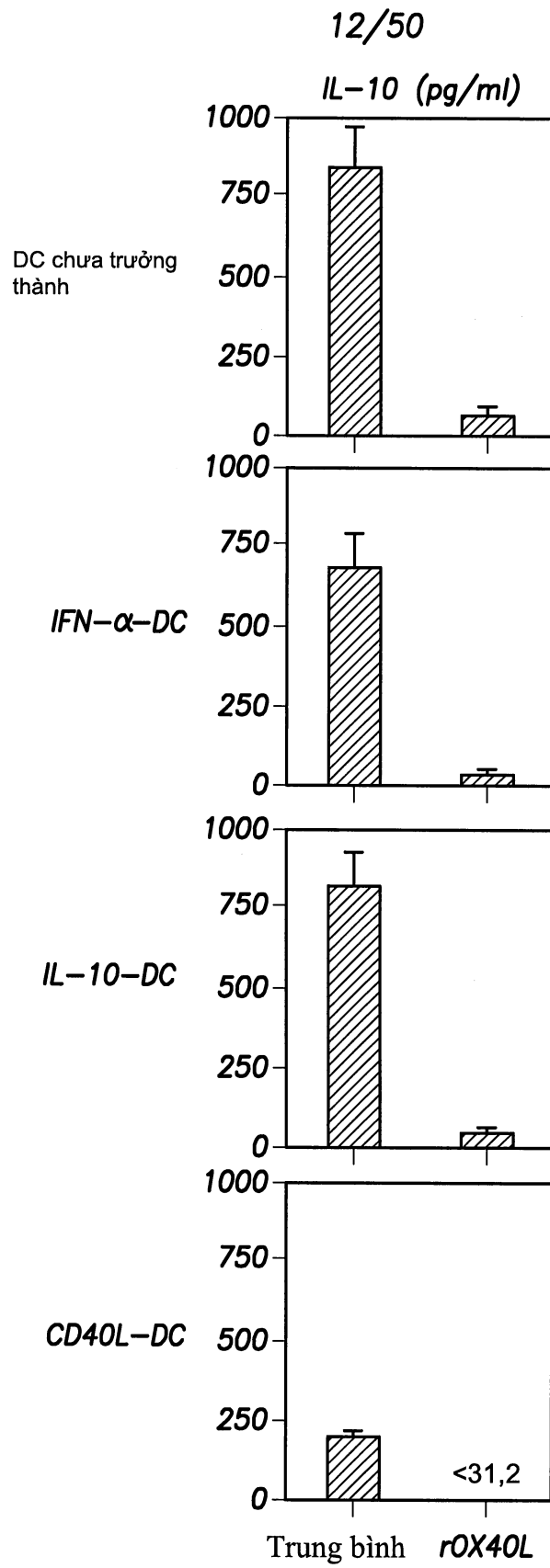


FIG.8E

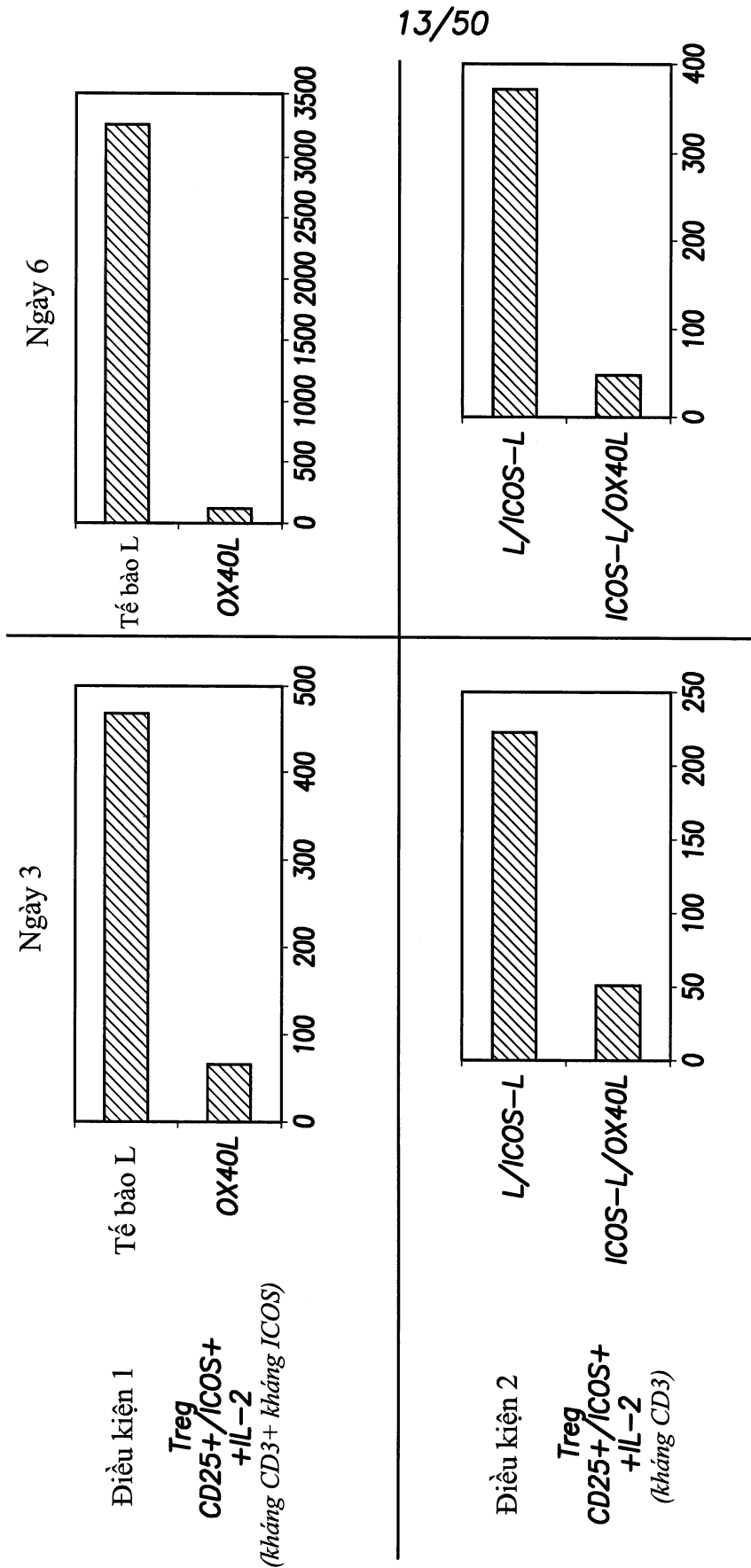
+

+

**FIG.8F**

+

+



IL-10 (pg/ml)

FIG.9

+

+

14/50

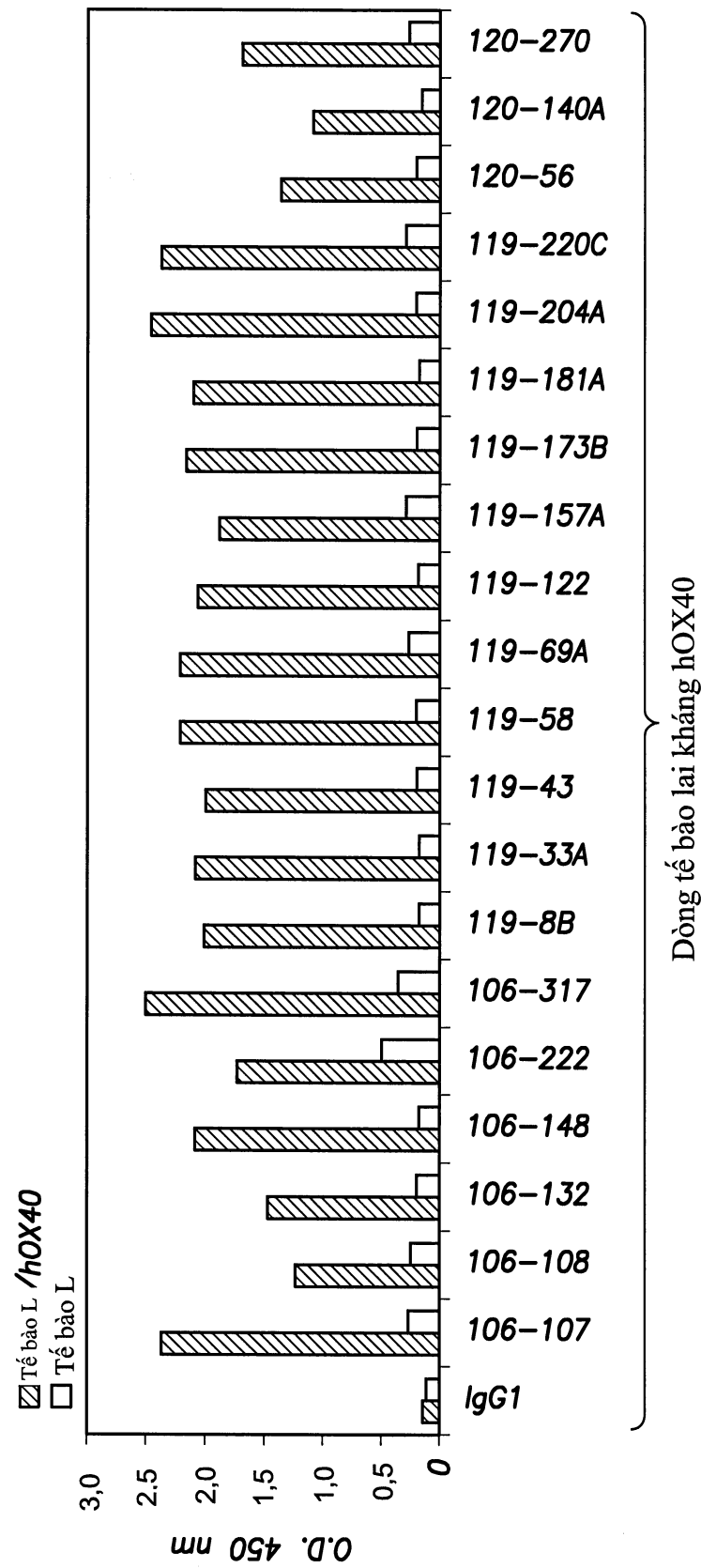


FIG. 10

+

+

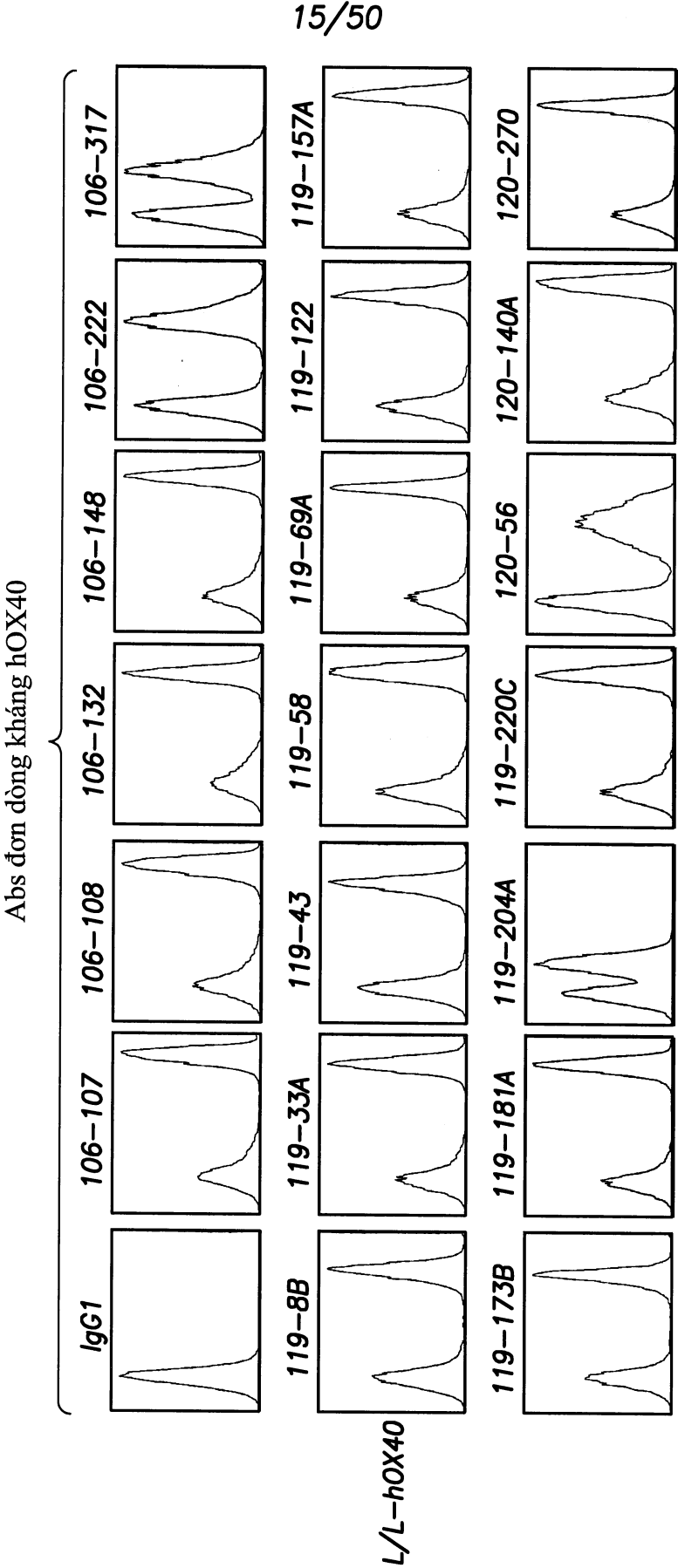


FIG.11

+

+

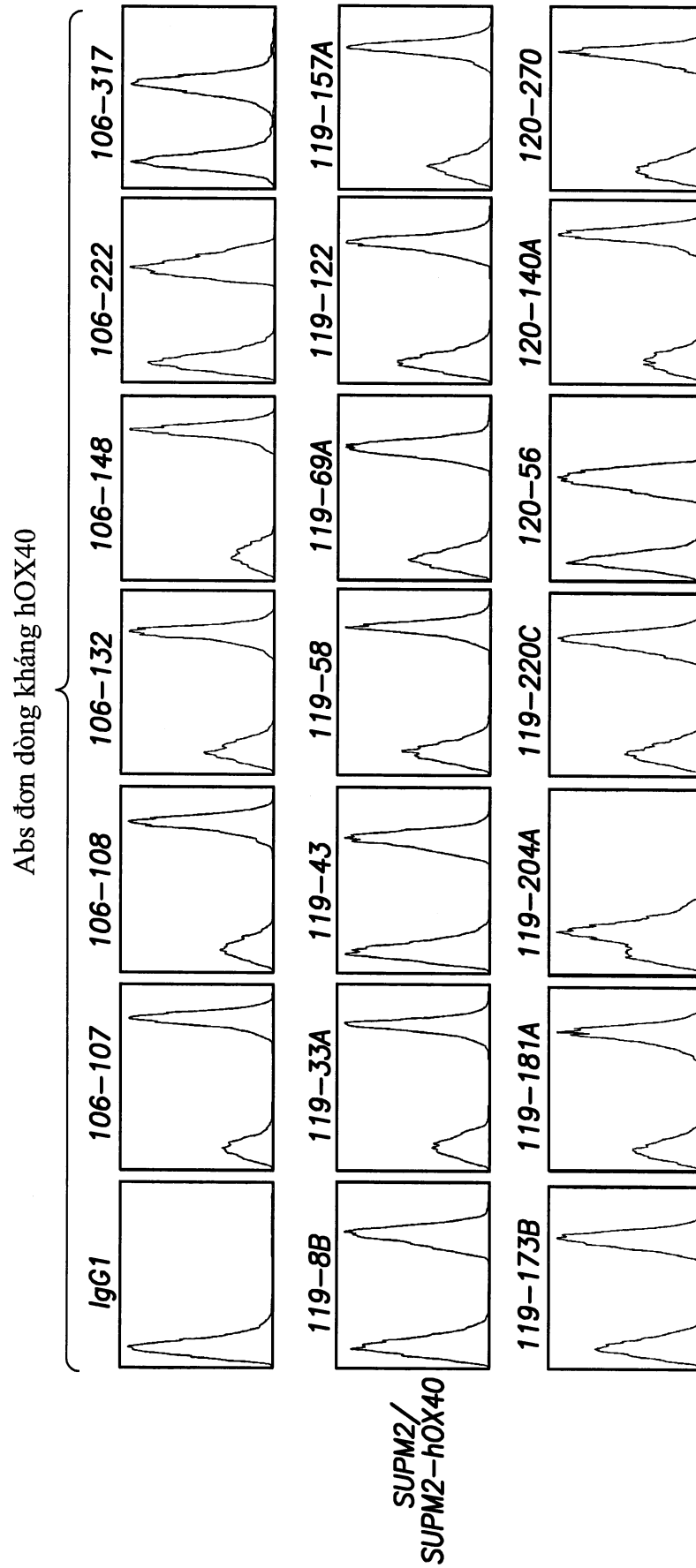


FIG.12

+

+

17/50

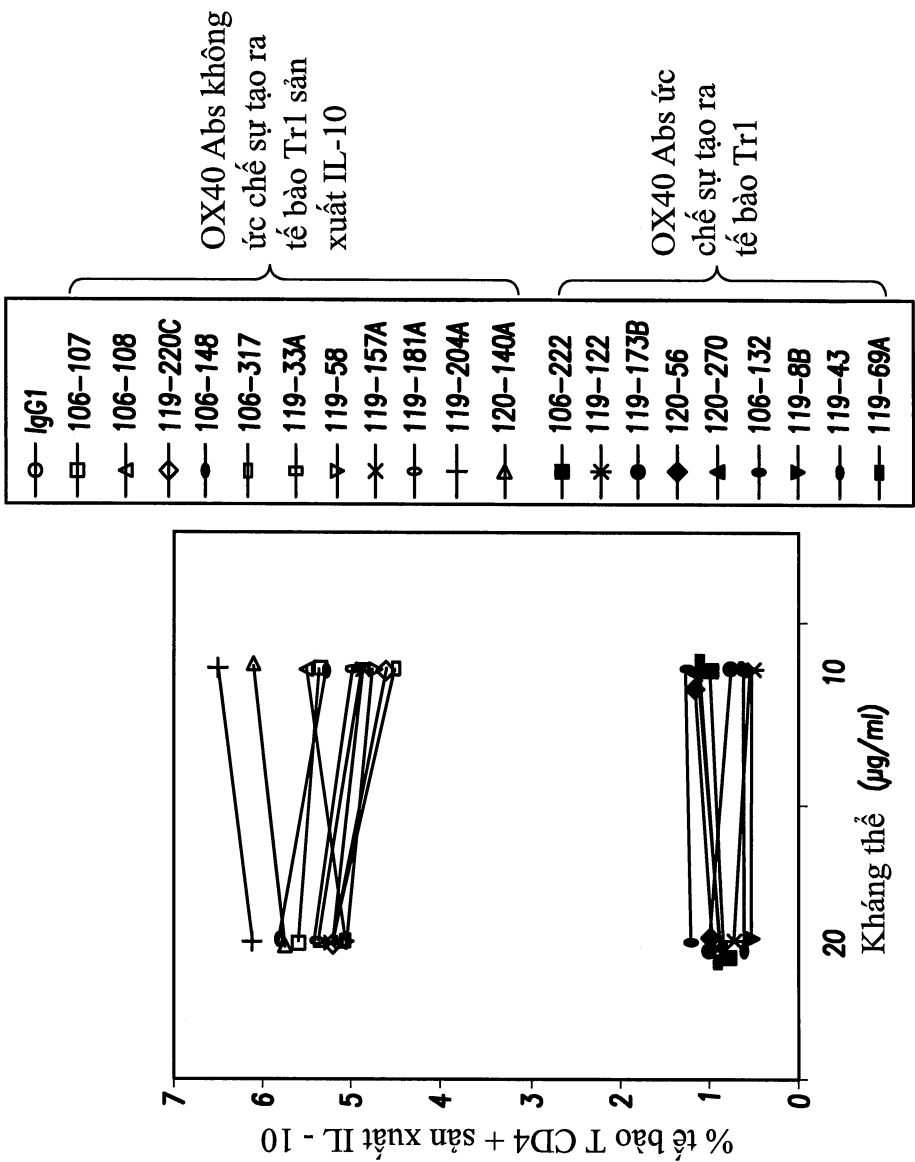


FIG.13B

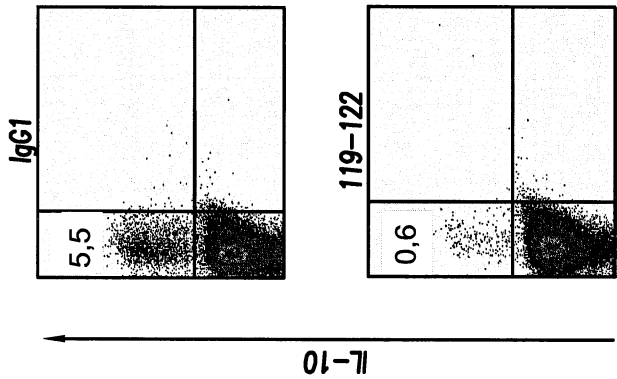


FIG.13A

+

+

18/50

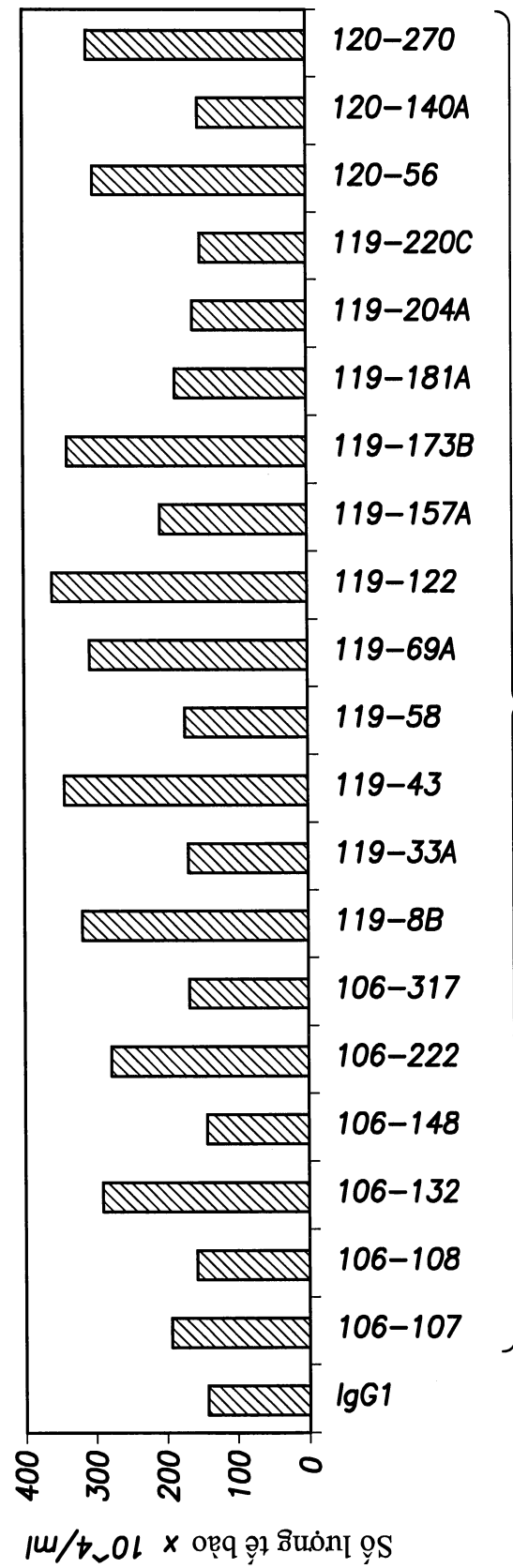


FIG. 14

+

+

19/50

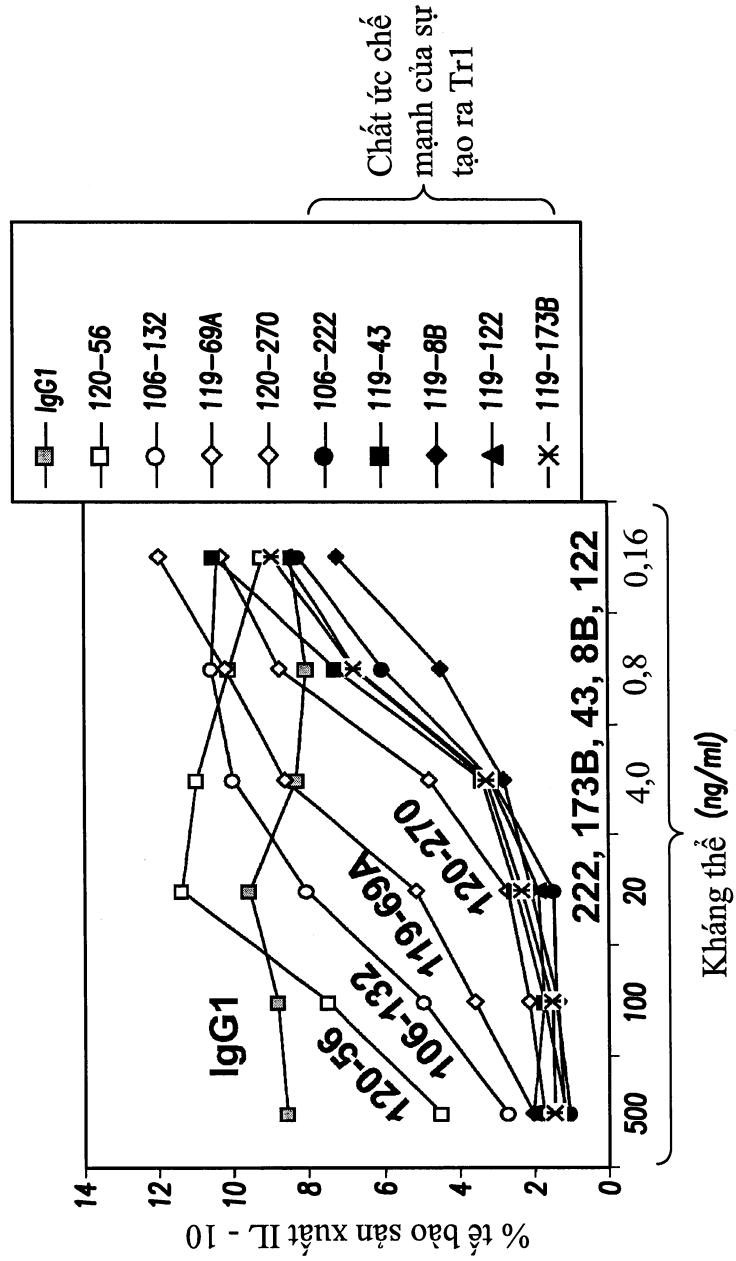


FIG.15B

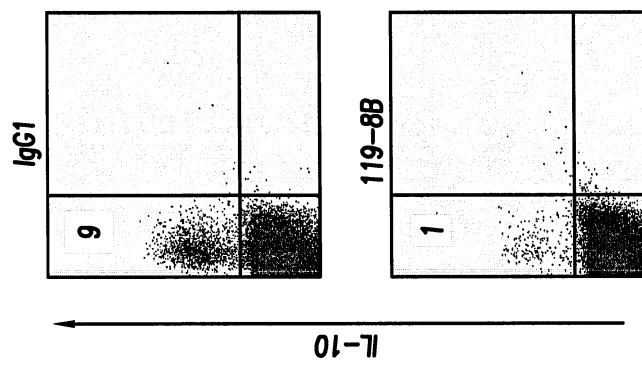
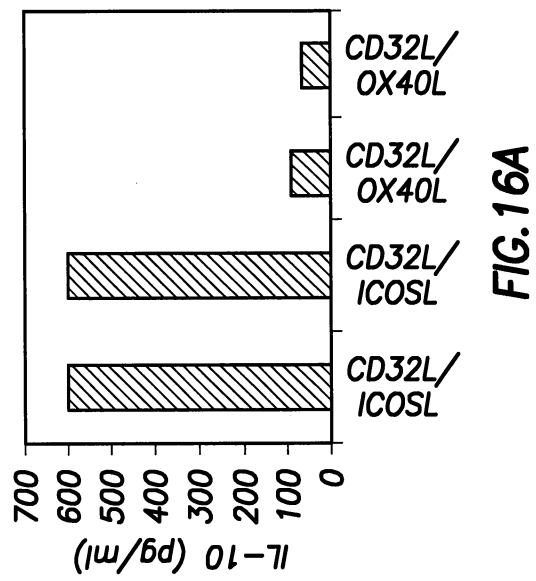
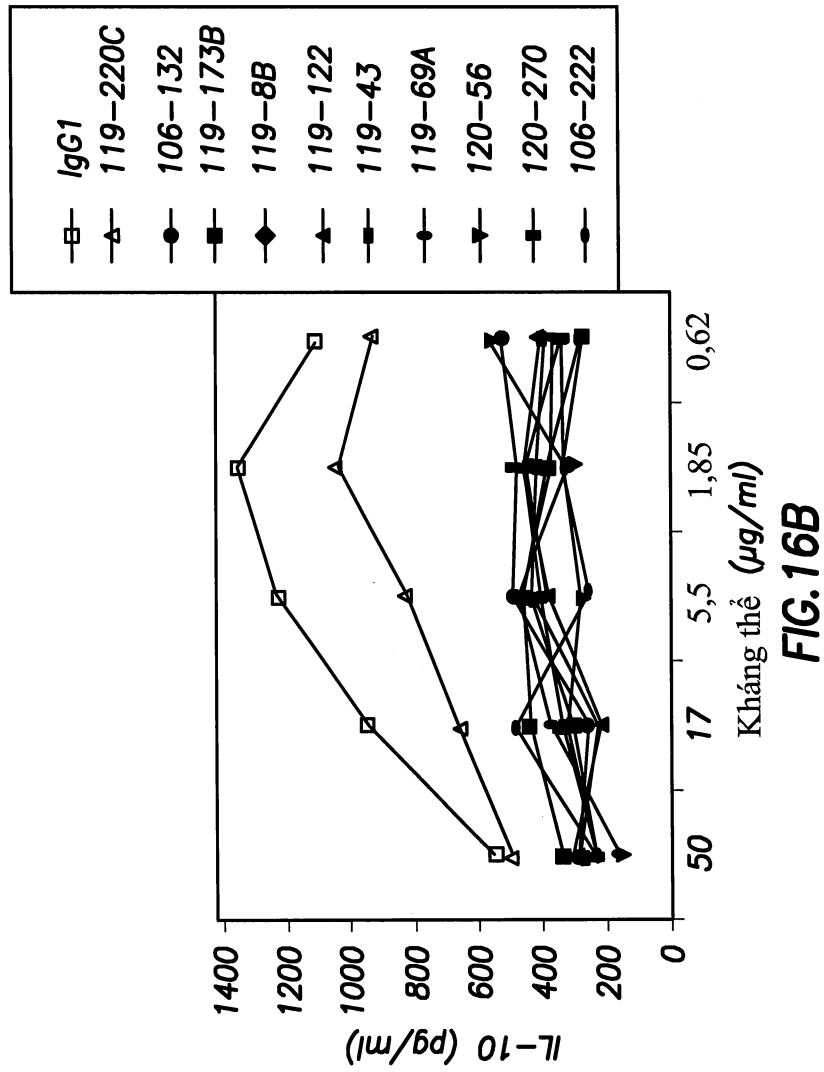


FIG.15A

+

+

20/50



+

+

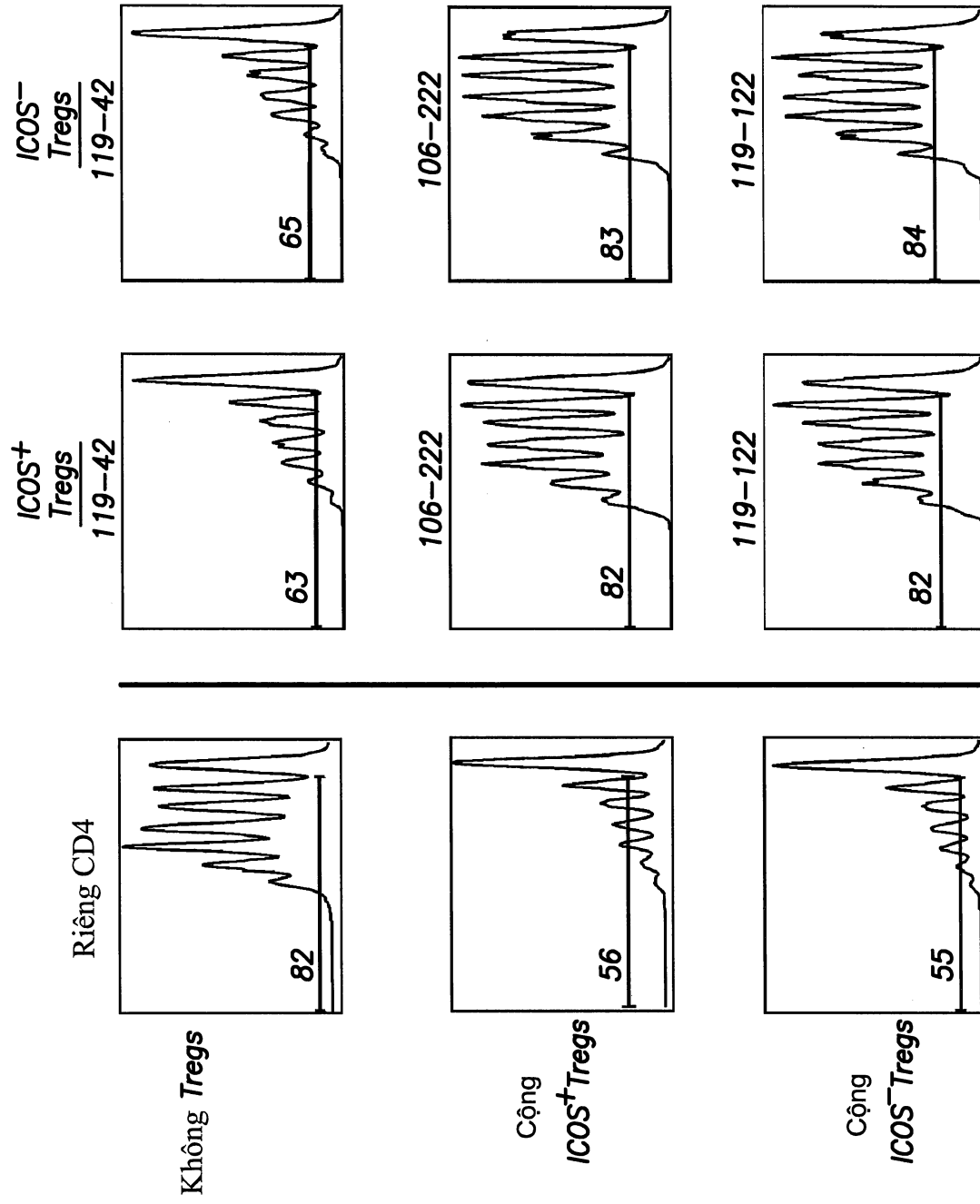


FIG.16C

+

+

22/50

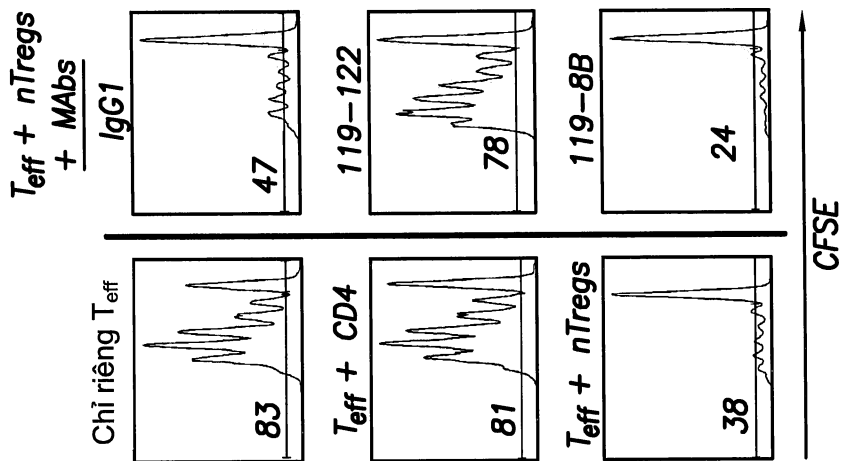
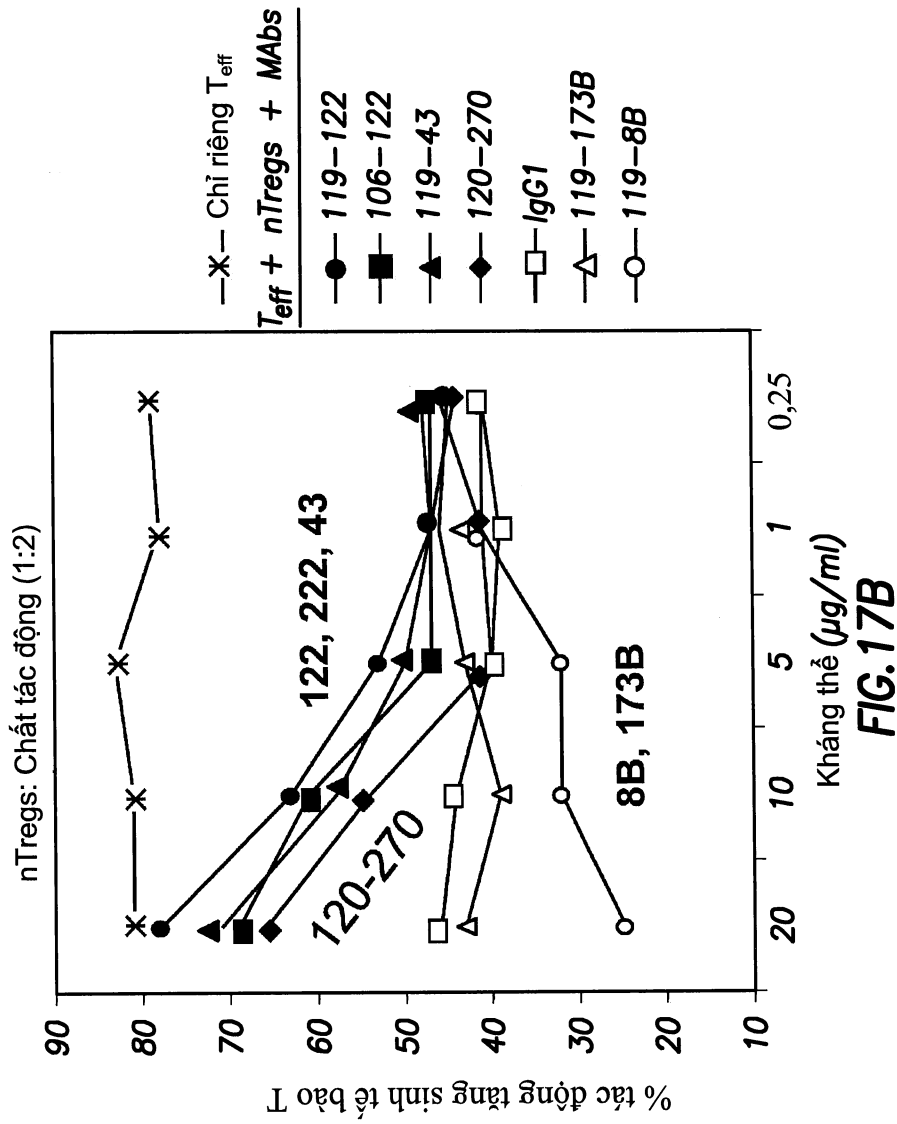


FIG.17A

+

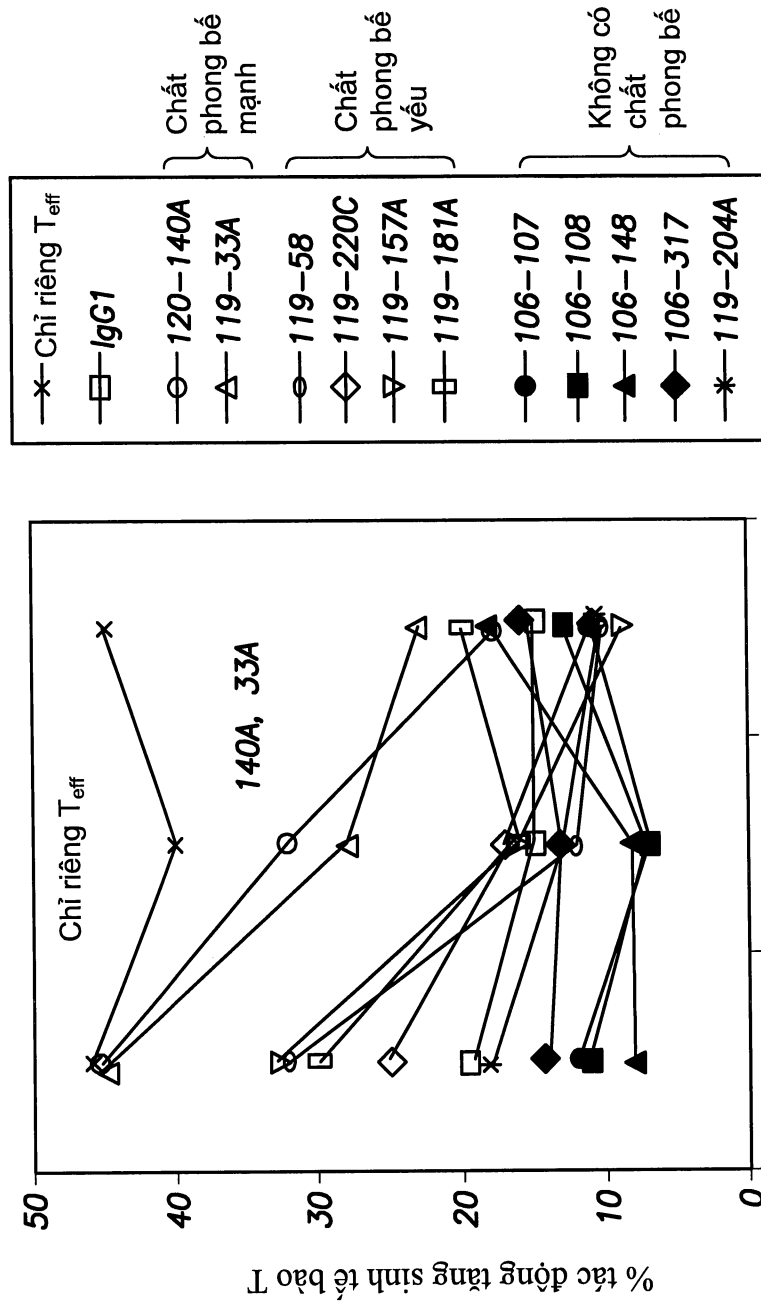


FIG.18

+

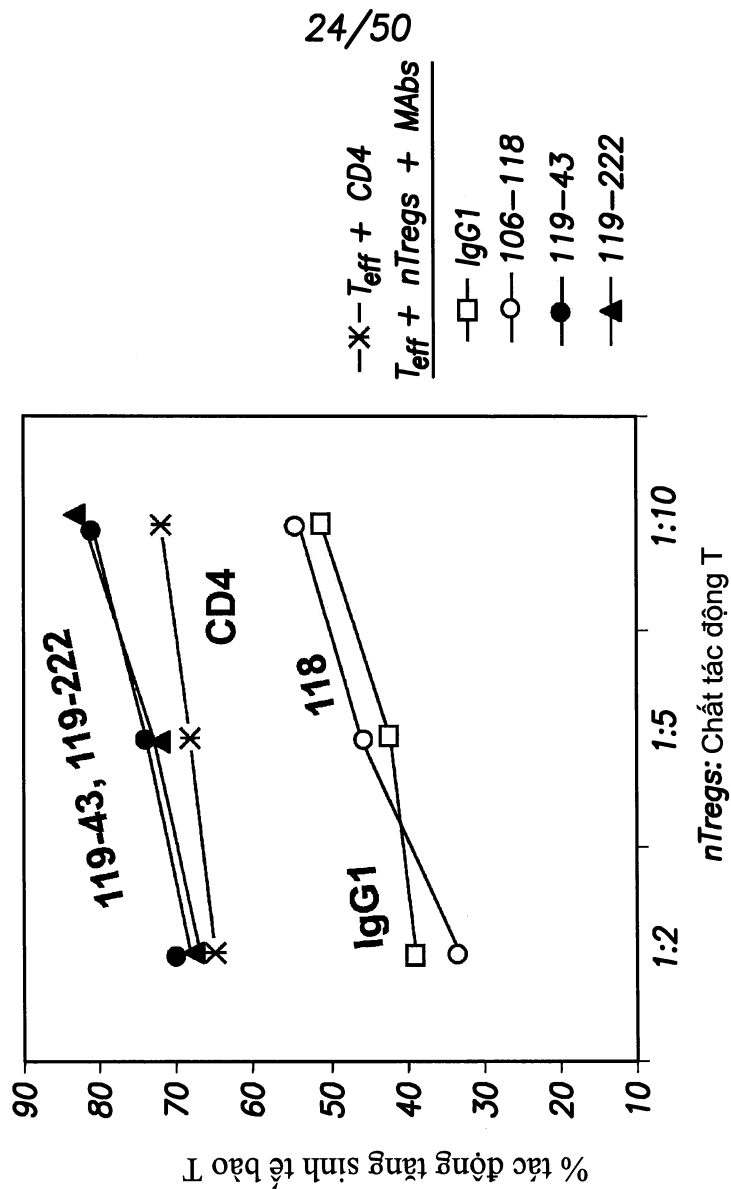


FIG.19B

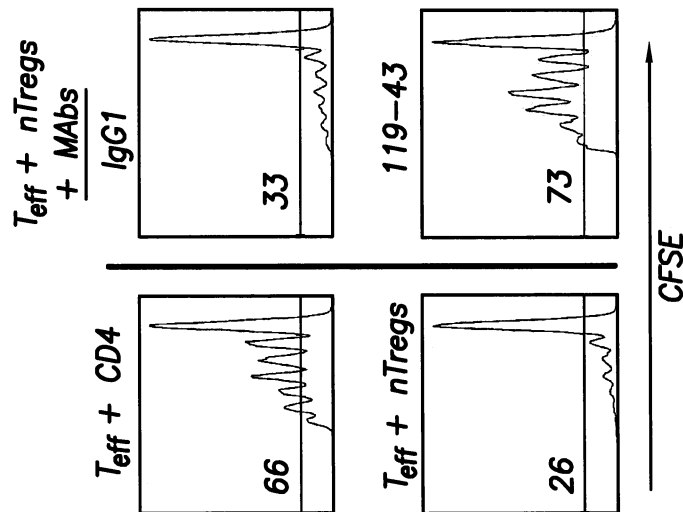


FIG.19A

+

+

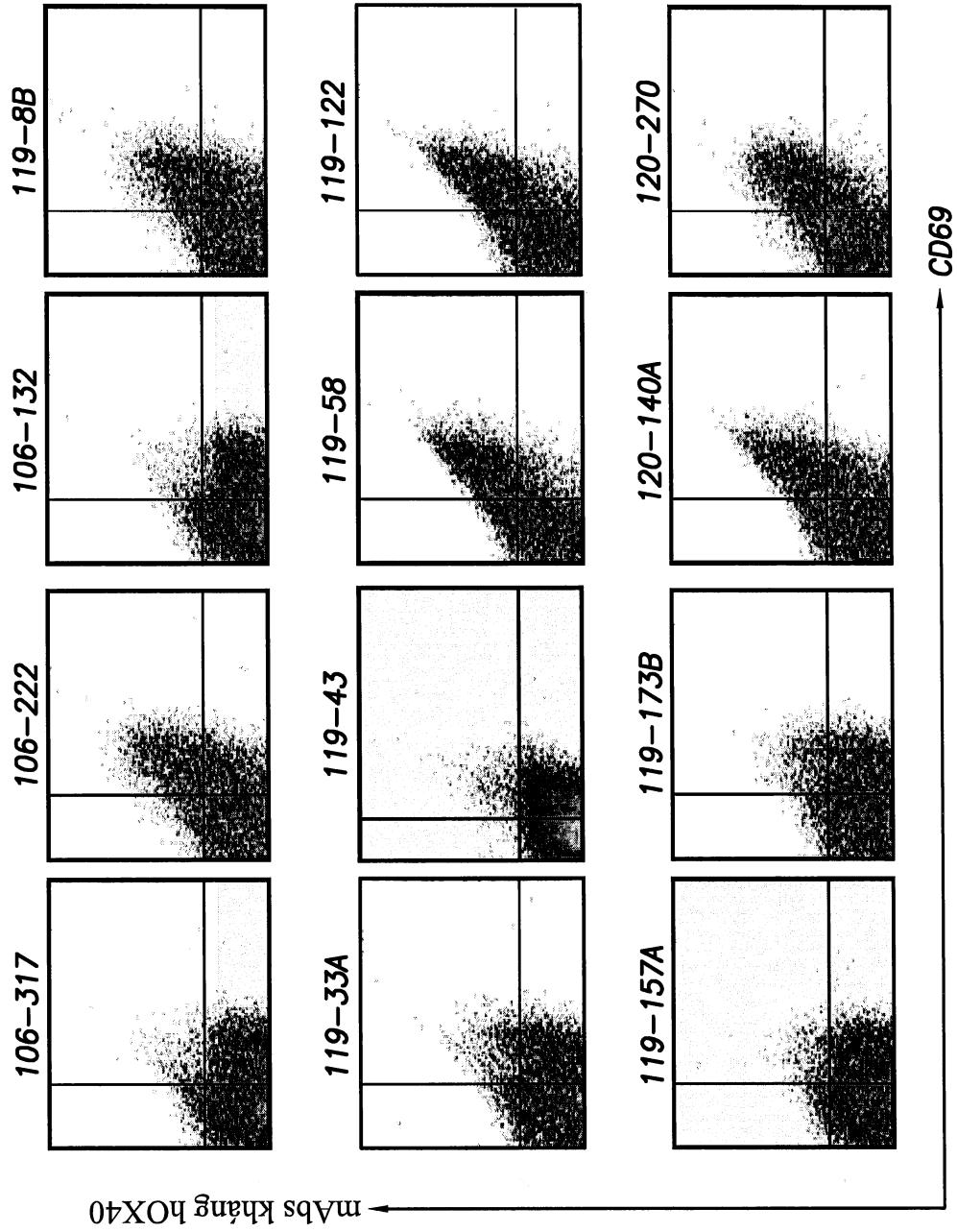


FIG.20

+

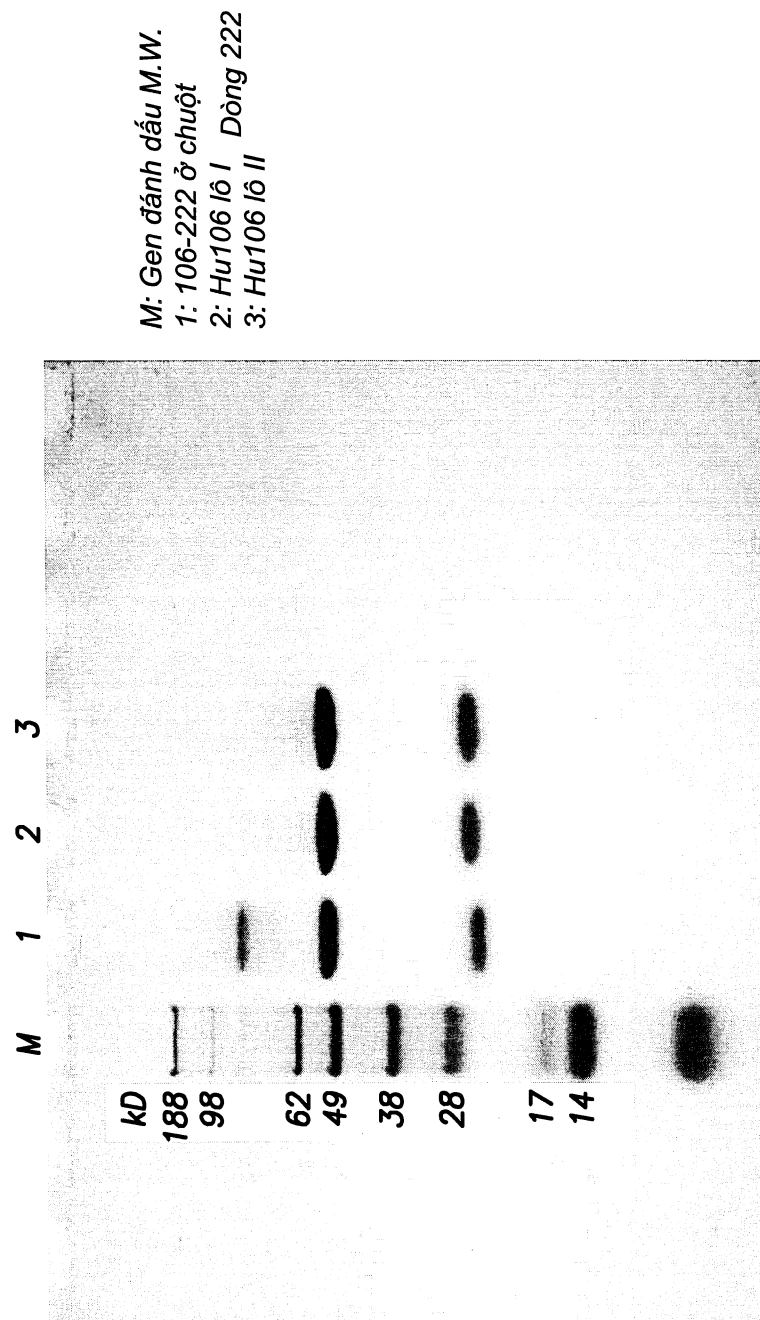


FIG.21

+

27/50

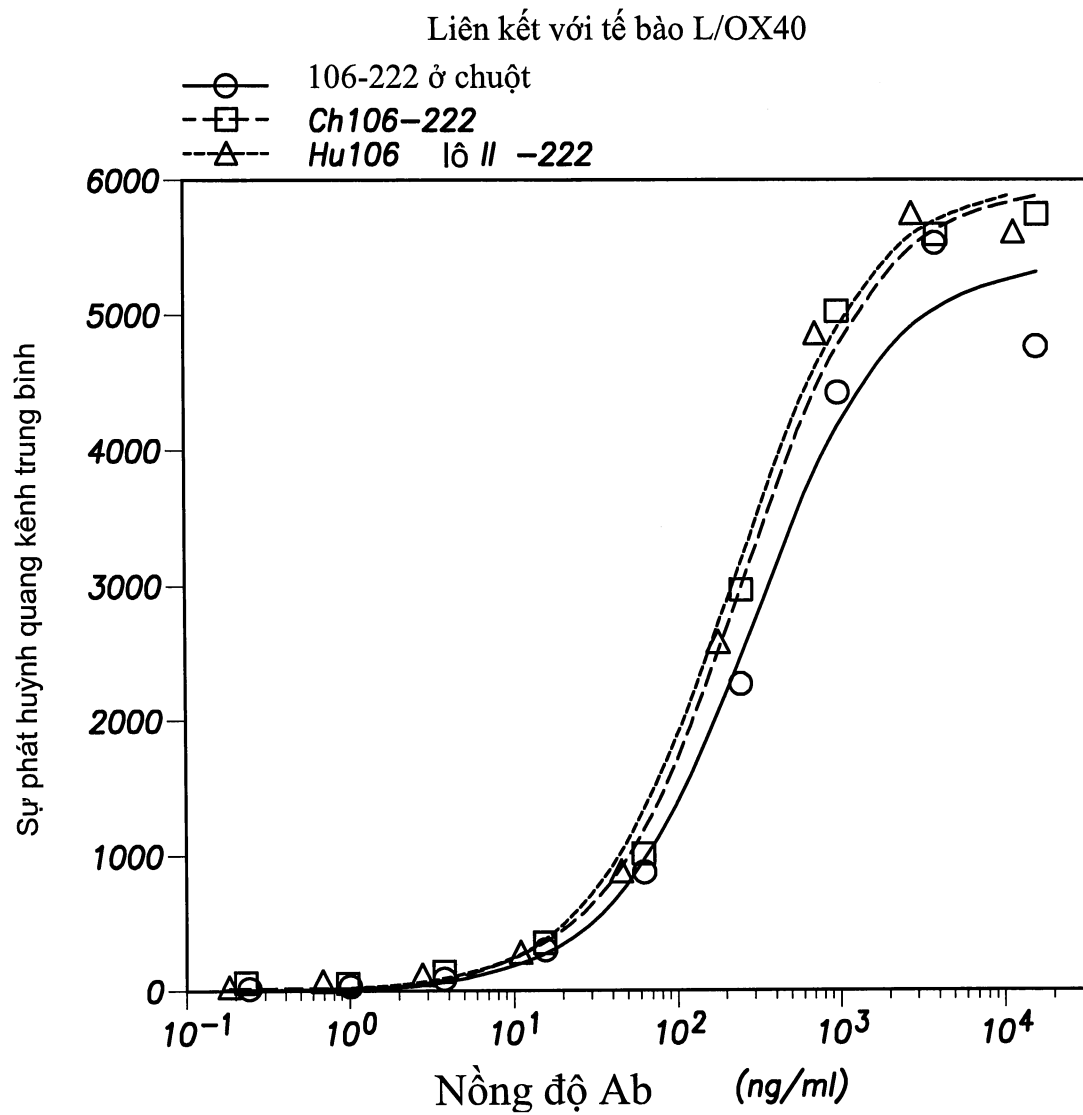


FIG.22

+

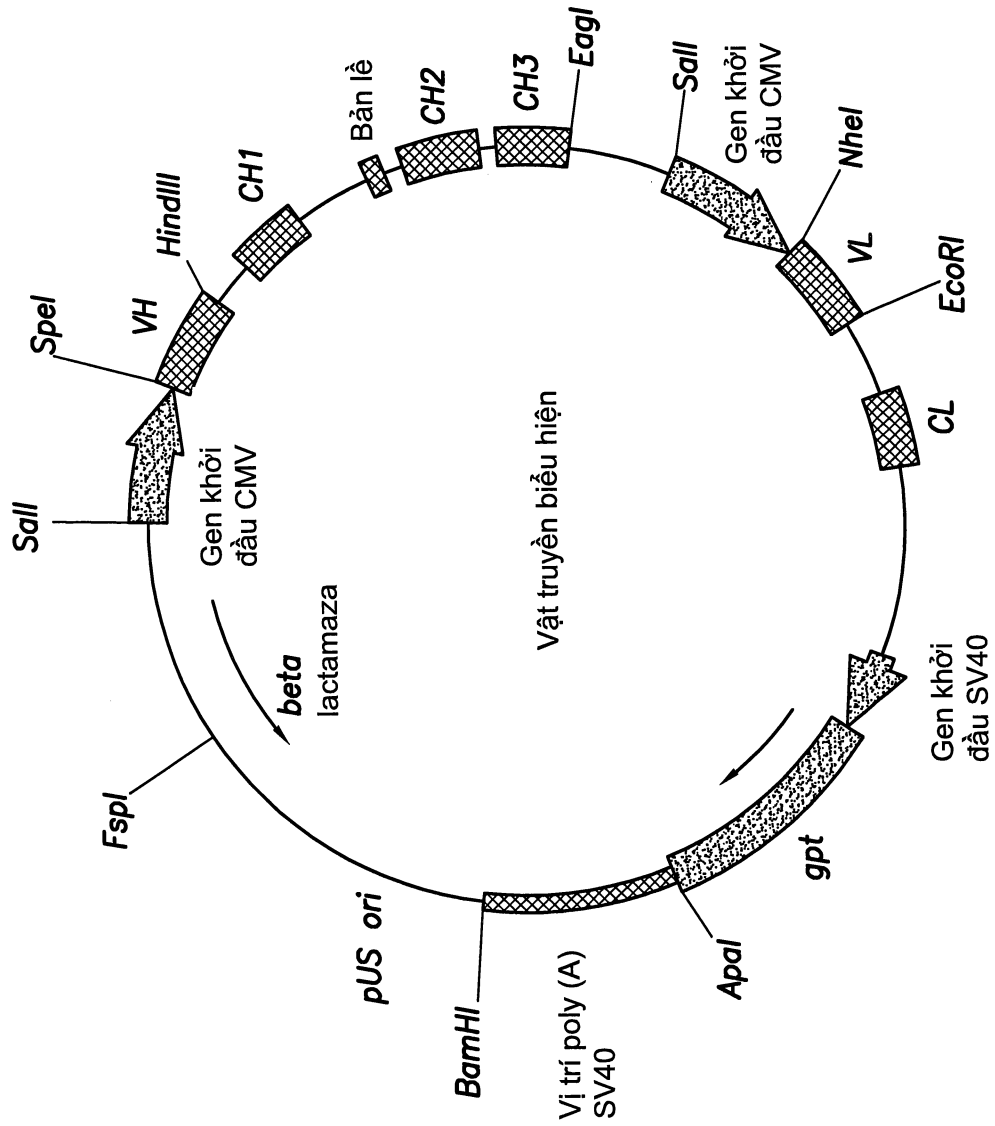


FIG.23

+

29/50

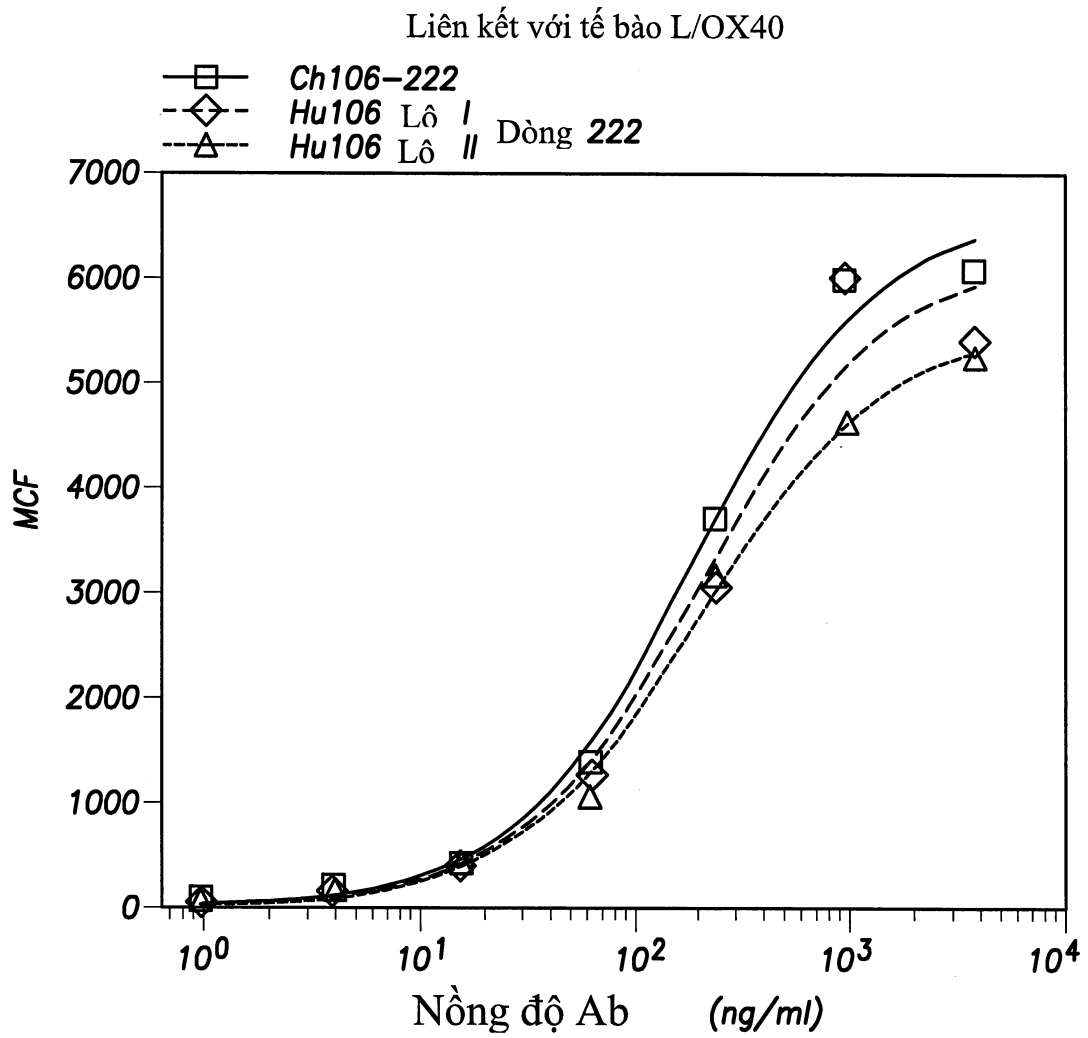


FIG.24

+

+

30/50

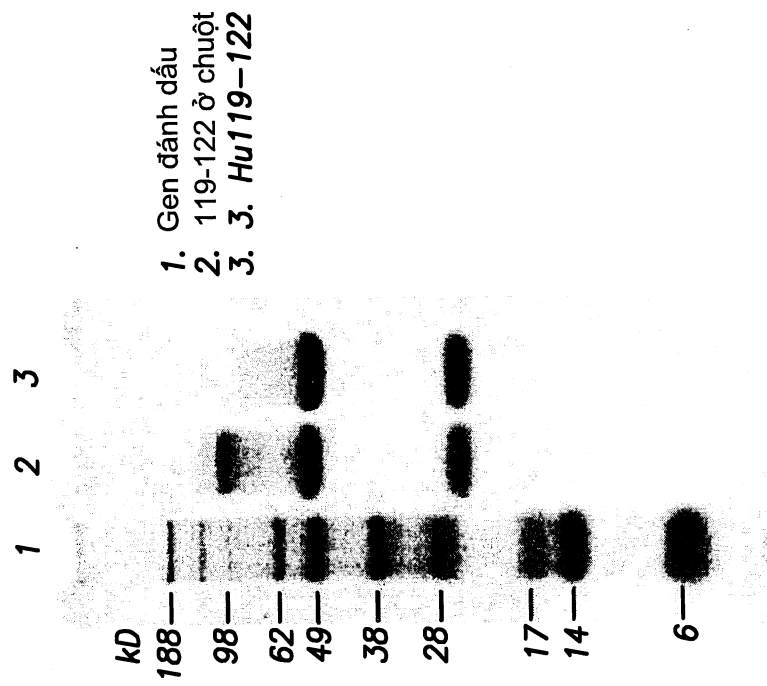


FIG.25

+

+

31/50

Liên kết với tế bào L/OX40

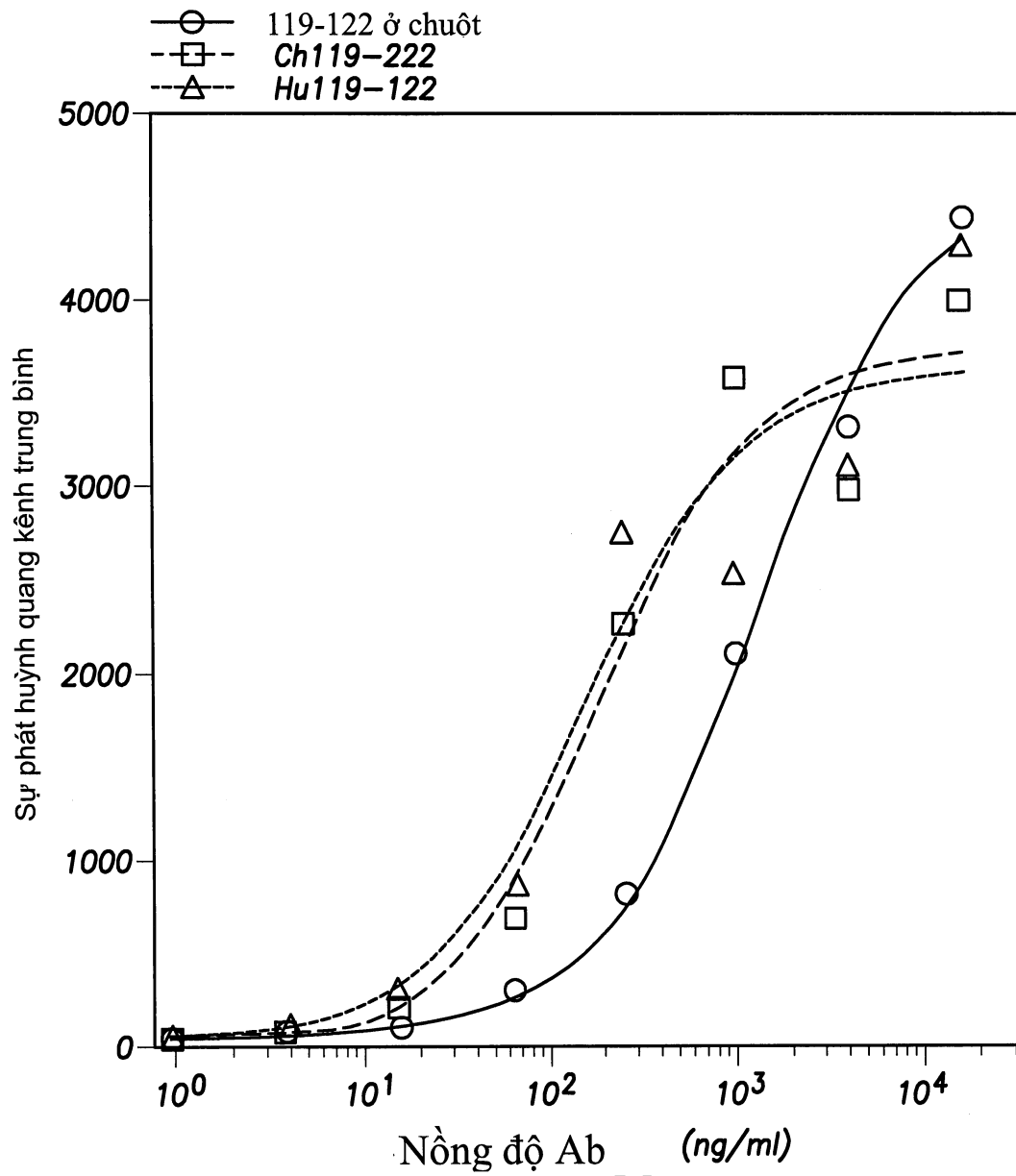
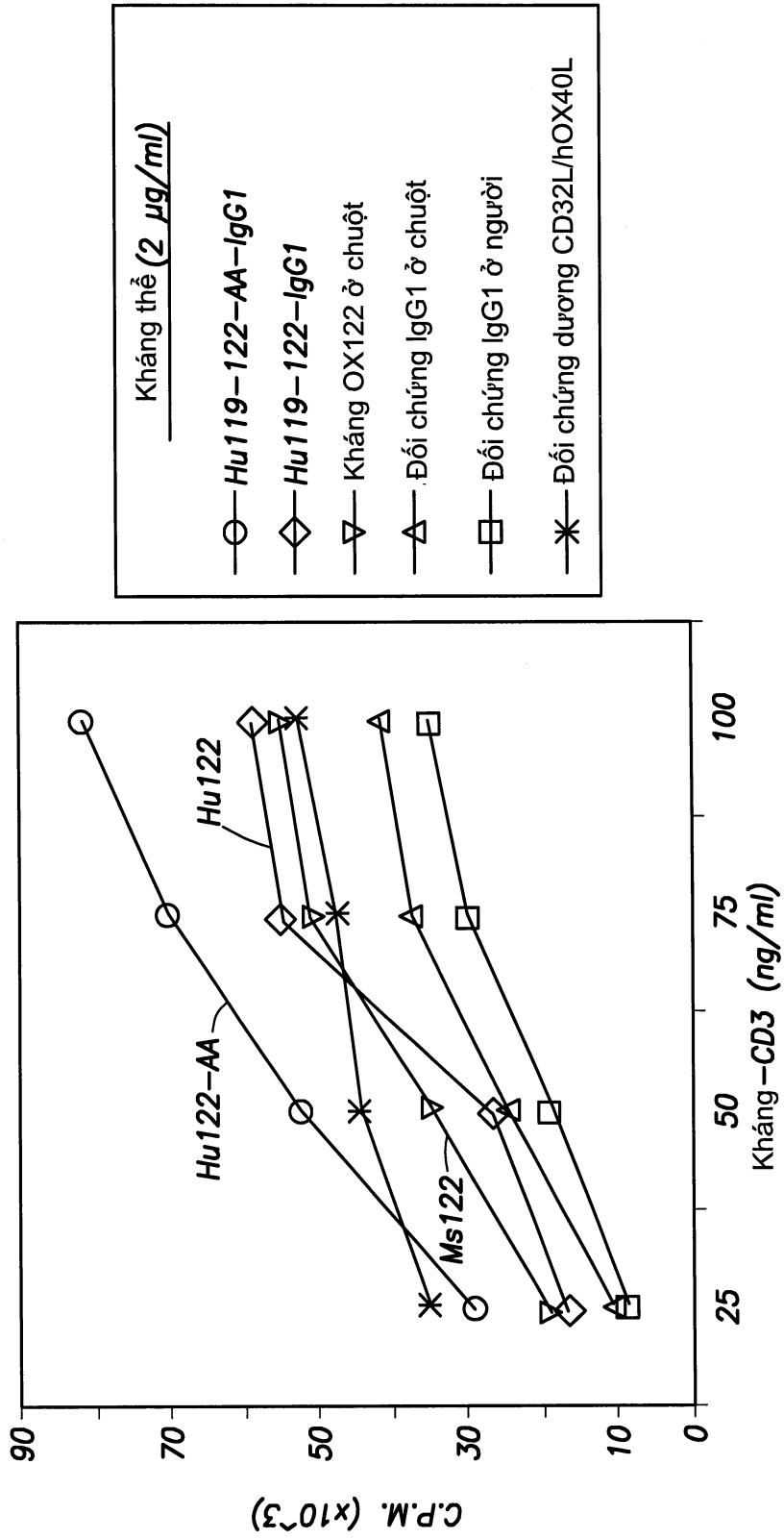


FIG.26

+

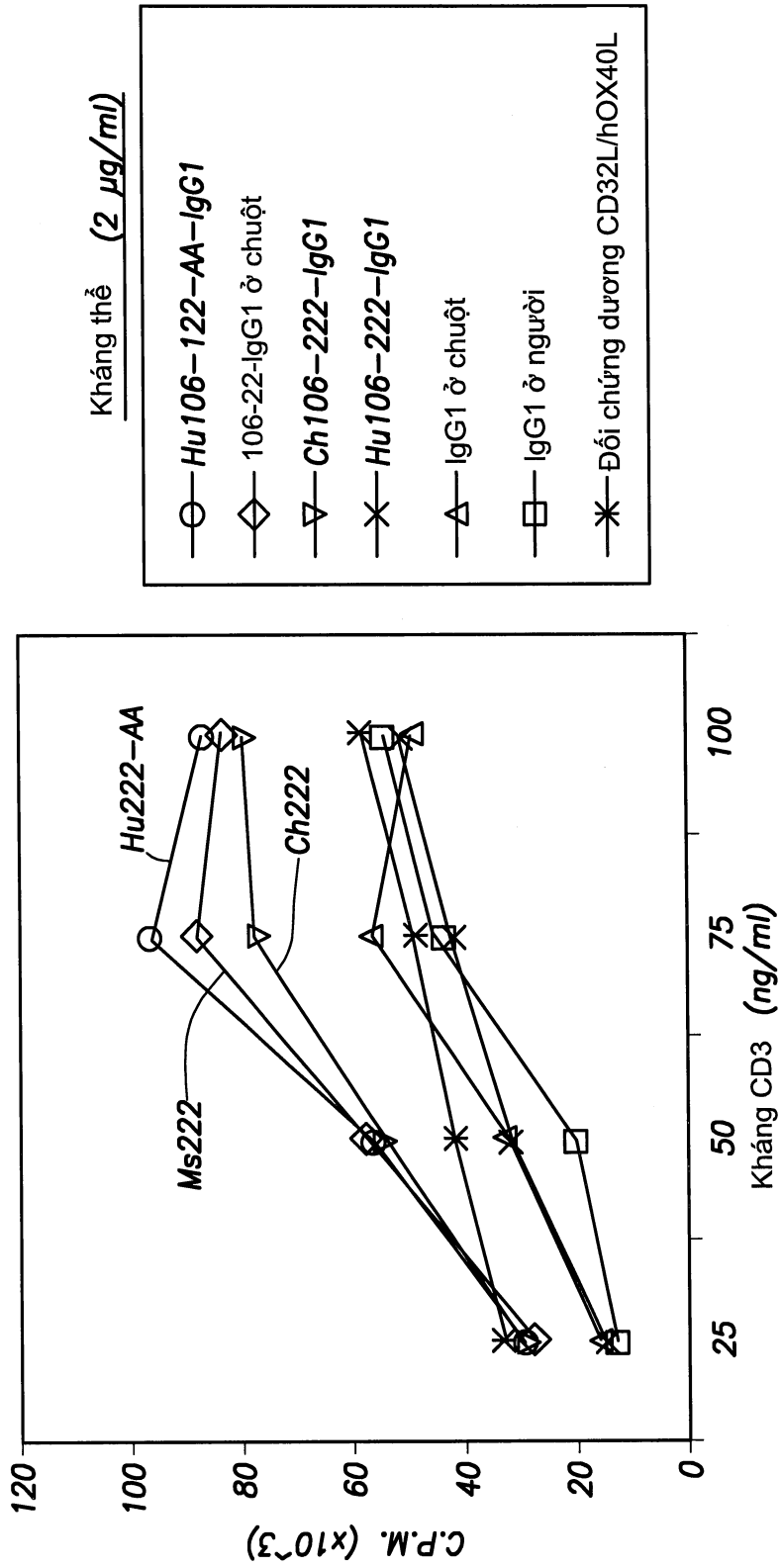
+



Hệ tế bào L

FIG.27

+



Hệ tế bào L

FIG.28

+

34/50

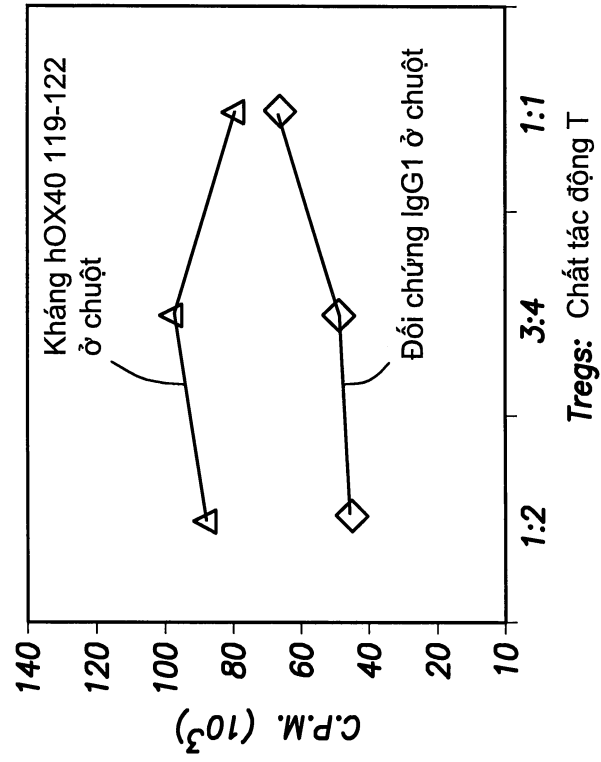


FIG.29B

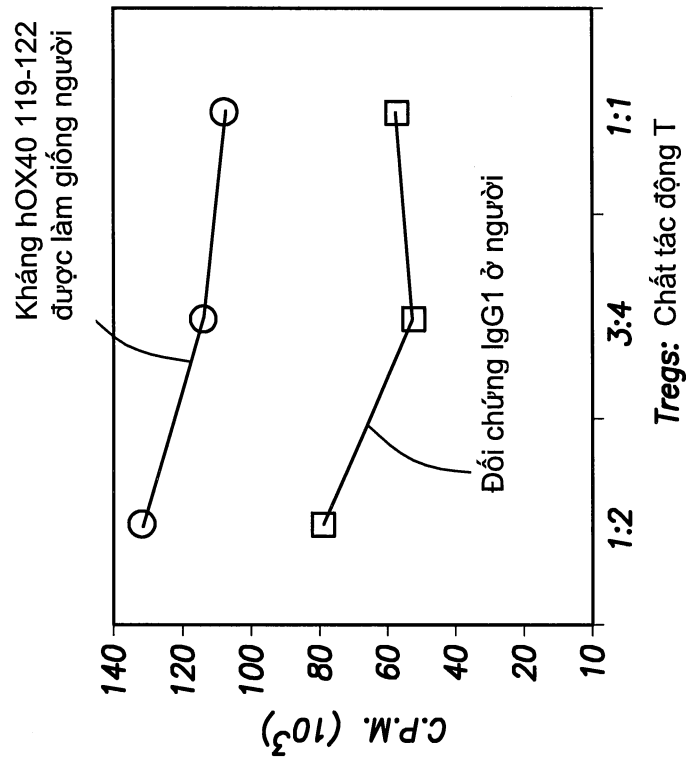


FIG.29A

+

+

35/50

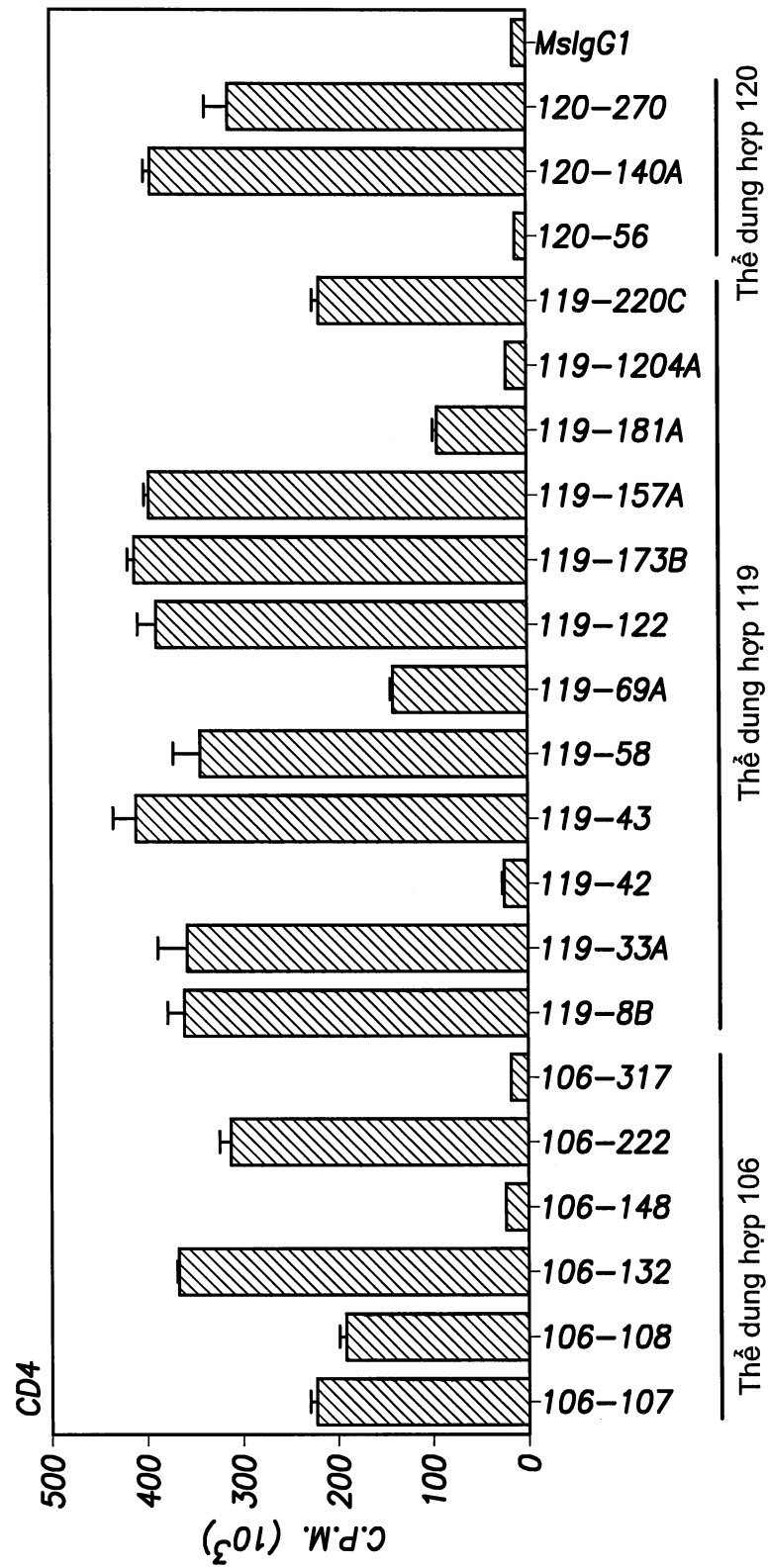


FIG.30A

+

+

36/50

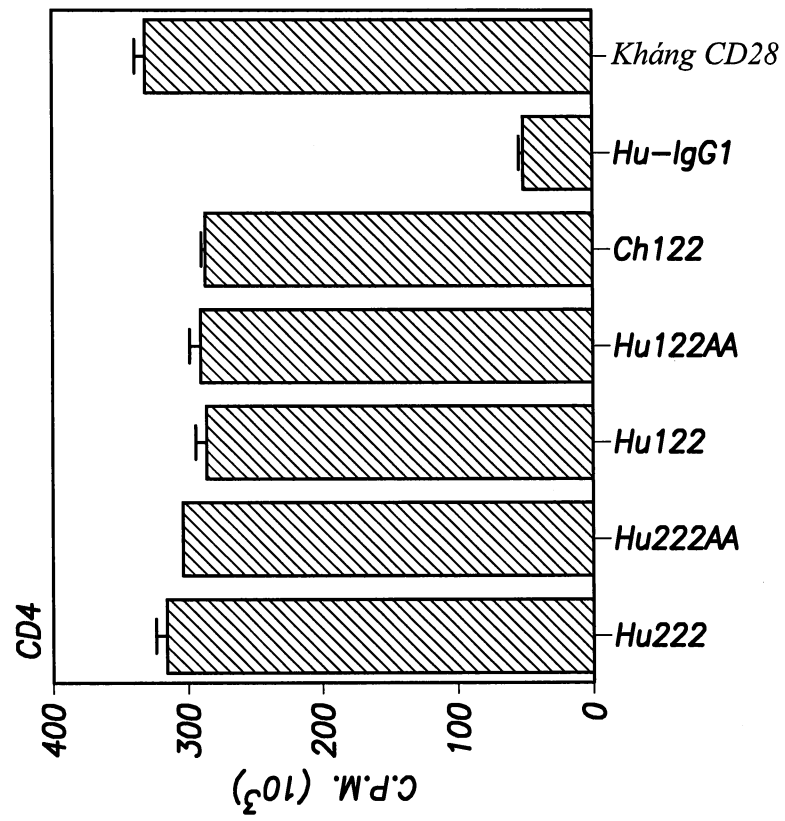


FIG. 30C

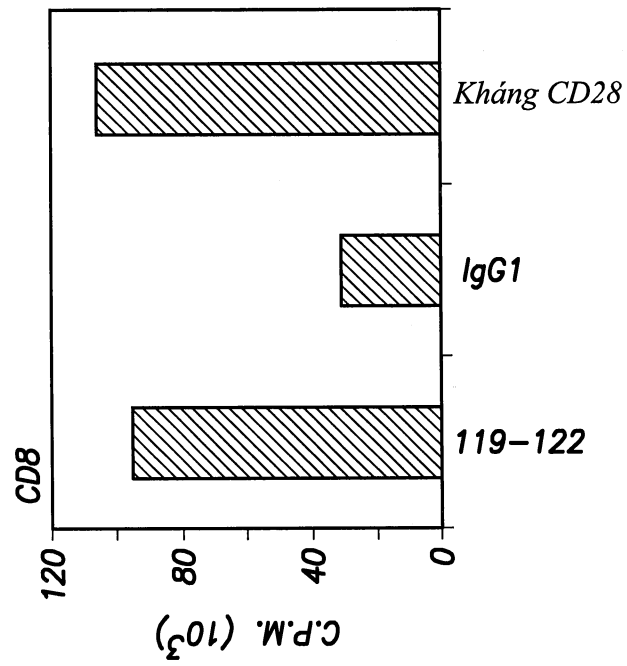


FIG. 30B

+

+

37/50

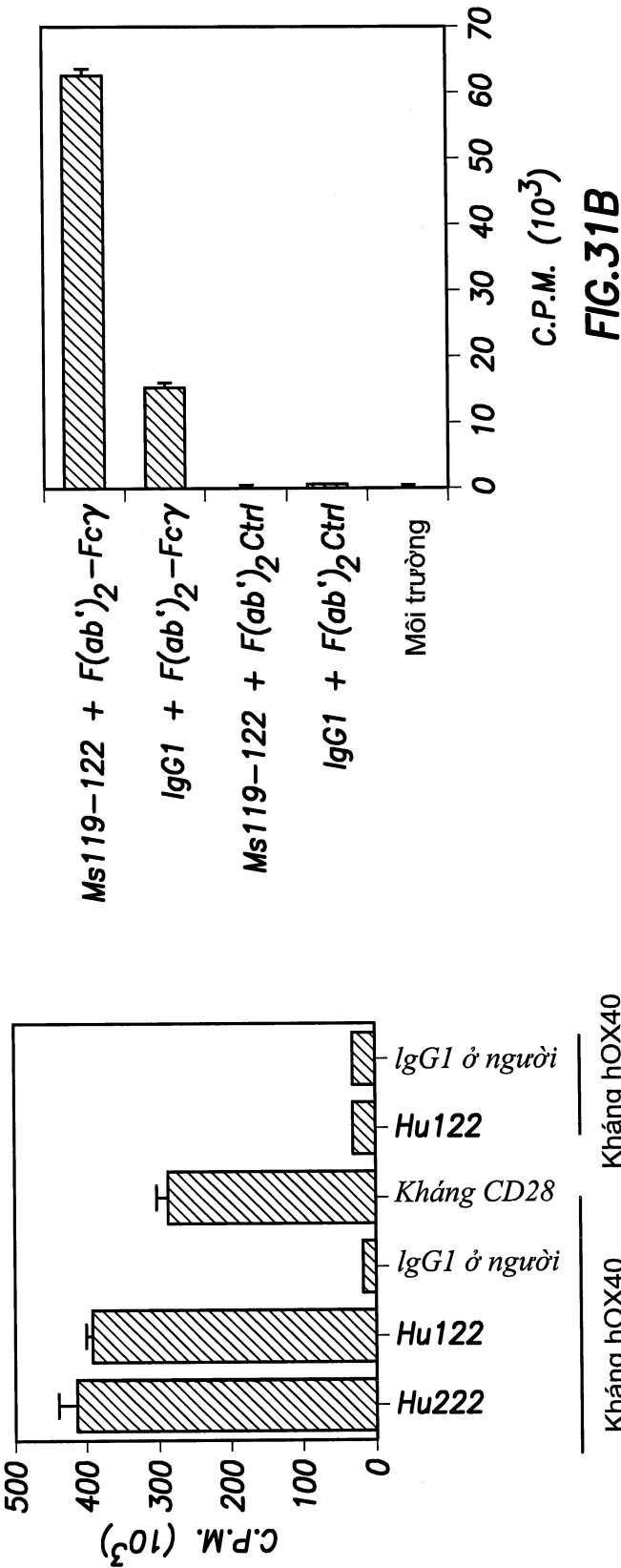


FIG. 31A

+

+

35/50

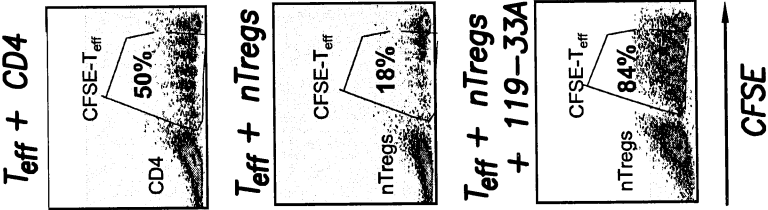
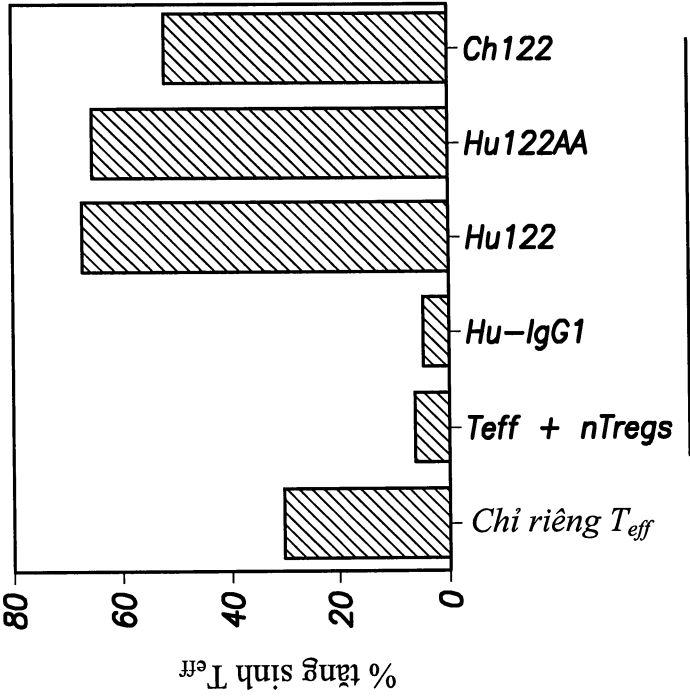


FIG.32A



T_{eff} + nTregs
+ Hu mAbs

FIG.32C

+

+

39/50

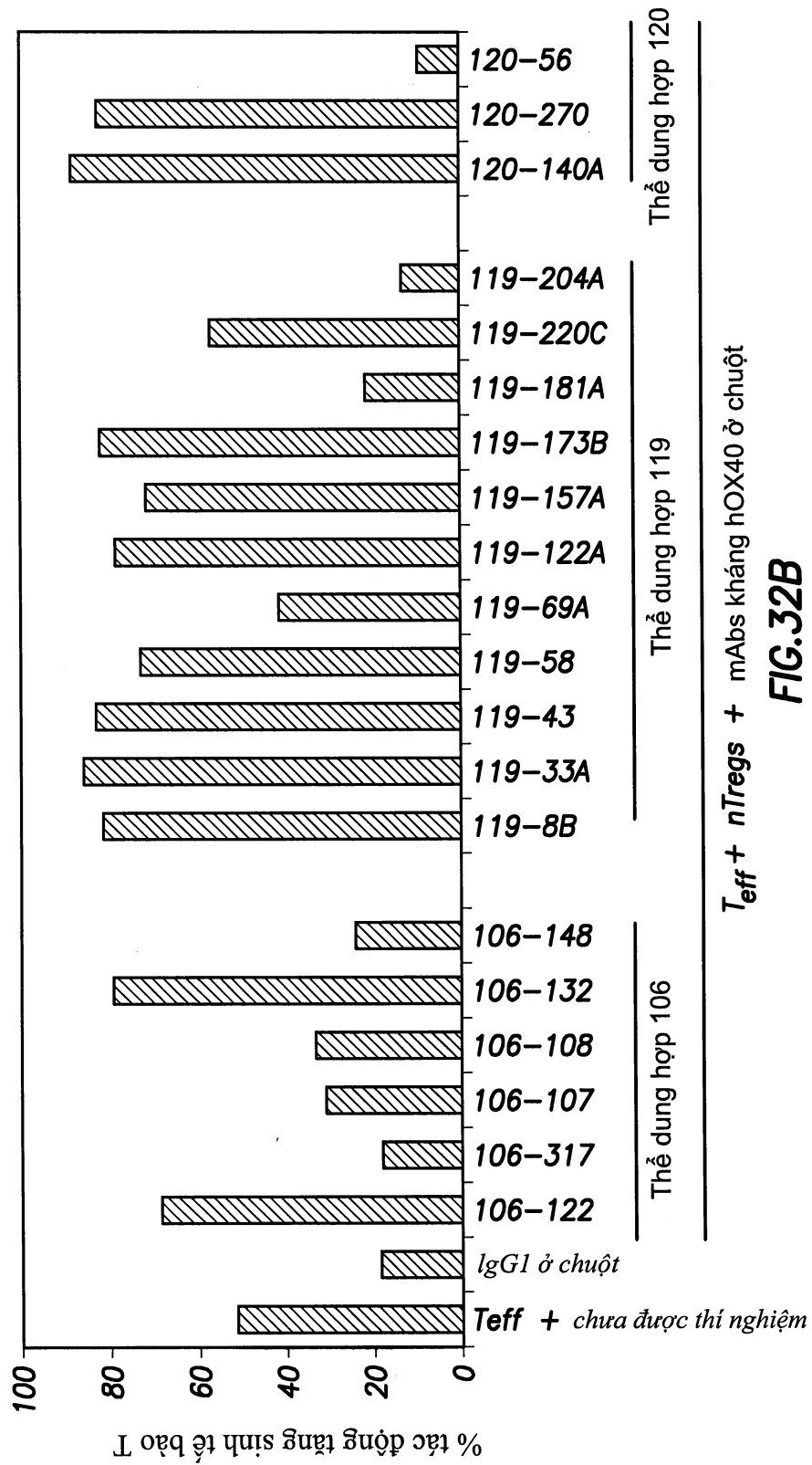


FIG.32B

+

+

40/50

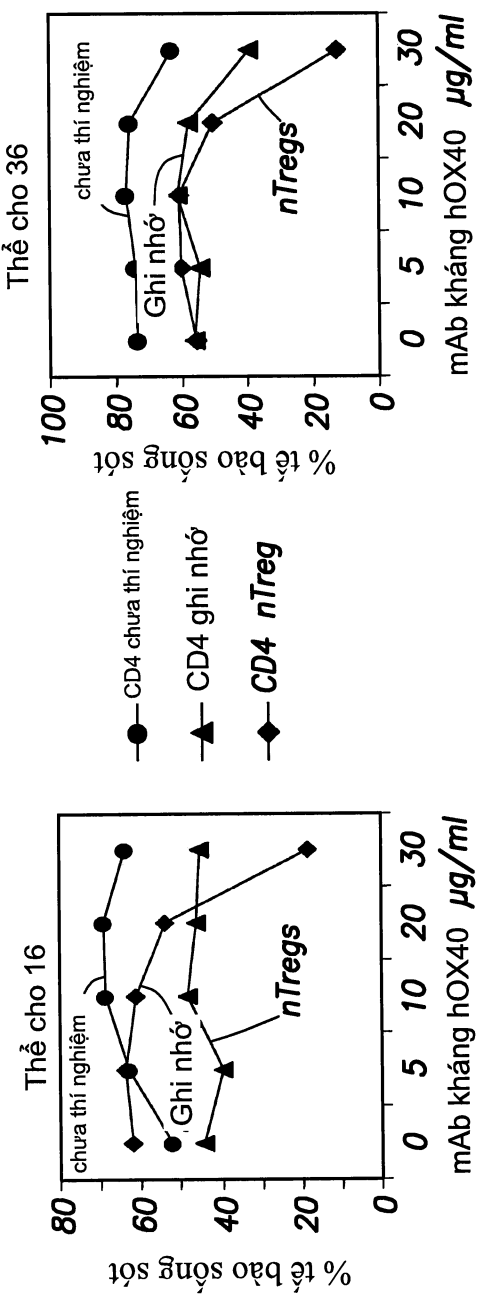


FIG.33A

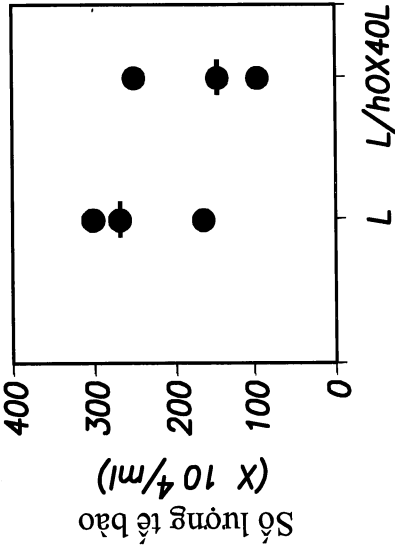


FIG.33C

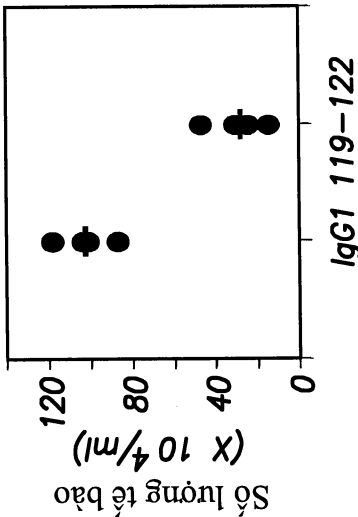


FIG.33B

+

+

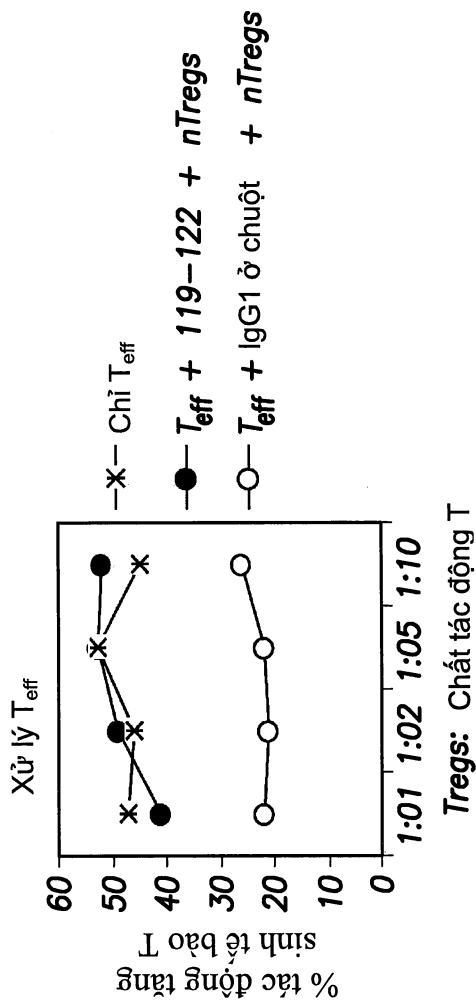


FIG.34A

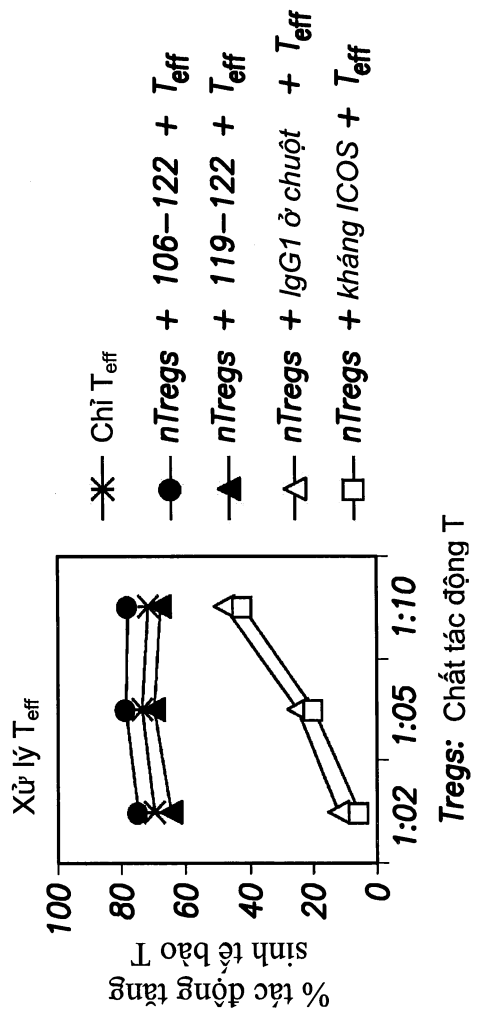


FIG.34B

+

+

106-222 VH

SEQ ID No.4	106-222 VH	1	2	3	CDR1	SEQ ID No.1
SEQ ID No.5	Hu106 VH					
	X61012					
		123456789	0123456789	0123456789	0123456789	
		QIQLVQSGP	ELKPGETVK	ISCKASGYTF	TDYSMHWVKQ	
		QVQLVQSGS	ELKPGASVK	VSCKASGYTF	TDYSMHWVRQ	
		QVQLVQSGS	ELKPGASVK	VSCKASGYTF	T-----WVRQ	

106-222 VH	4	5	6	7
Hu106 VH				
X61012				
	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
	APGKGLKWMG	WINTETGEPTY	ADDFKGRFAF	SLETSASTAY
	APGQGLKWMG	WINTETGEPTY	ADDFKGRFVF	SLDTSVSTAY
	APGQGLEWMG	-----	-----RFVF	SLDTSVSTAY

106-222 VH
Hu106 VH
X61012

24246

43/50

106-222 VH	8	9	1	0	1
Hu106 VH					
X61012					
	0122223456789	0123456789	000000123456789	0123	
	LQINNLKNETAT	YFCANPYDY	VSYYAMDYWGHTSV	TVSS	
	LQISSSLKAEDTAV	YYCANPYDY	VSYYAMDYWGQTTV	TVSS	
	LQISSSLKAEDTAV	YYCAR-----	-----WGKGTTV	TVSS	

106-222 VH
Hu106 VH
X61012

FIG.36

+

+

106-222 VL		CDR1 SEQ ID No.7		
SEQ ID No.10	106-222 VL	1	2	3
SEQ ID No.11	Hu106 VL	123456789	0123456789	0123456789
	AJ388641	DIVMTQSHK	FMSTSVRDRV	SITCKASQDV STAVAWYQQK
		DIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCKASQDV STAVAWYQQK
		DIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITC-----WYQQK
		CDR2 SEQ ID No.8		
		4	5	6
		0123456789	0123456789	0123456789
		PGQSPKLLIY	SASYLYTGVP	DRFTGSGSGT DFTFTISSLQ
		PGKAPKLLIY	SASYLYTGVP	SRFSGSGSGT DFTFTISSLQ
		PGKAPKLLIY	-----GVP	SRFSGSGSGT DFTFTISSLQ
		CDR3 SEQ ID No.9		
		8	9	1
		0123456789	0123456789	01234567
		AEDLAVYYCQ	QHYSTPRTFG	GGTKLEIK
		PEDIATYYCQ	QHYSTPRTFG	GGTKLEIK
		PEDIATYYC-	-----FG	GGTKLEIK

FIG.37

+

+

Hu106-222 VH

SEQ ID No.6

SpeI

ACTAGTACCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTATTCTGTATGGCAGCTGCCCAAAGT

M A W V T L L F L M A A Q S

ATCCAAGCACAGGTTTCAGTTGGTGCAGTCTGGATCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGCCTCA

I Q A Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S

GTCAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGTTATACCTTCACAGACTATTCAATGCACTGGGTG

V K V S C K A S G Y T F T D Y S M H W V

CGACAGGCTCCAGGACAAGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACTGAGACTGGTGAG

R Q A P G Q G L K W M G W I N T E T G E

CCAACATATGCAGATGACTTCAAGGGACGGTTTGTCTTCTCTTTGGACACCTCTGTCAGC

P T Y A D D F K G R F V F S L D T S V S

ACTGCCTATTTGCAGATCAGCAGCCTCAAAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCT

T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A

AATCCCTACTATGATTACGTCTCTTACTATGCTATGGACTACTGGGTCAGGGAACCACG

N P Y Y D Y V S Y Y A M D Y W G Q G T T

GTCAACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTCAAGCTT

V T V S S

45/50

24246

FIG.38

+

+

Hu106-222 VL

NheI

SEQ ID No.12

GCTAGCACCACCATGGAGTCACAGATTCAGGTCCTTTGTATTTCGTGTTTCTCTGTGTCTCT
M E S Q I Q V F V F V F V F L W L S

GGTGTTGACGGAGACATTCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCCGCATCAGTGGGA
G V D G D I Q M T Q S P S S L S A S V G

GACAGGGTCACCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTAT
D R V T I T C K A S Q D V S T A V A W Y

CAACAGAAACCAGGAAAGCCCTAAACTACTGATTTACTCGGCATCCTACCTCTACACT
Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y L Y T

GGAGTCCCTTCACGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACTTTCACCATCAGC
G V P S R F S G S G S G T D F T F T I S

AGTCTGCAGCCTGAAGACATTGCAACATATTACTGTGAGCAACATTATAGTACTCCTCGG
S L Q P E D I A T Y Y C Q Q H Y S T P R

ACGTTTCGGTCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGTAAGTAGAATCCAAAGAAATTC
T F G Q G T K L E I K

EcoRI

FIG.39

+

+

119-122 VH

SEQ ID No.16	119-122 VH	1	2	3	CDR1 SEQ ID No.13
SEQ ID No.17	Hu119 VH				
	Z14189	123456789	0123456789	0123456789	0123456789
		EVQLVESGG	GLVQPGESLK	LSCESNEYEF	PSHDM SWVRK
		EVQLVESGG	GLVQPGGSLR	LSCAASEYEF	PSHDM SWVRQ
		EVQLVESGG	GLVQPGGSLR	LSCAASGFTF	S-----WVRQ

4	5	6	7
0123456789	01223456789	0123456789	0123456789
	a	CDR2 SEQ ID No.14	
TPEKRLELVA	AINSDGGSTYY	PDTMERRFII	SRDNTKKKTLY
APGKGLELVA	AINSDGGSTYY	PDTMERRFTI	SRDNAKNSLY
APGKGLEWVA	-----	-----RFTI	SRDNAKNSLY

119-122 VH
Hu119 VH
Z14189

24246

47/50

8	9	1	0	1
012223456789	0123456789	0000123456789	0123	
	abc	abc	CDR3 SEQ ID No.15	
LQMSSLRSEDAL	YYCARHYDDY	YAWFAYWQQGTLV	TVSA	
LQMNSLRAEDTAV	YYCARHYDDY	YAWFAYWQQGTMV	TVSS	
LQMNSLRAEDTAV	YYCAR-----	-----WQQGTMV	TVSS	

119-122 VH
Hu119 VH
Z14189

FIG.40

+

+

119-122 VL					
SEQ ID No.22	119-122 VL	1	2	3	
SEQ ID No.23	Hu119 VL	123456789	0123456789	01234567777789	0123456789
M29469			abcd	CDR1 SEQ ID No.19	
		DIVLTQSPA	SLAVSLGQRA	TISCRASKSVSTSG	YSYMHWWYQQK
		EIVLTQSPA	TLSLSPGERA	TLSCRASKSVSTSG	YSYMHWWYQQK
		EIVLTQSPA	TLSLSPGERA	TLSC-----	-----WYQQK
		CDR2 SEQ ID No.20			
		4	5	6	7
		0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
		PGQPPKLLIY	LASNLESGVP	ARFSGSGSGT	DFTLNHPVE
		PGQAPRLLIY	LASNLESGVP	ARFSGSGSGT	DFTLTISSLE
		PGQAPRLLIY	-----GVP	ARFSGSGSGT	DFTLTISSLE
		CDR3 SEQ ID No.21			
		8	9	0	1
		0123456789	0123456789	01234567	
		EEDAATYYCQ	HSRELPLTFG	AGTKLELK	
		PEDFAVYYCQ	HSRELPLTFG	GGTKVEIK	
		PEDFAVYYC-	-----FG	GGTKVEIK	

FIG.41

+

+

Hu119-122 VH
Seq ID No.18
SpeI
ACTAGTACCACCATGGACTTCGGGCTCAGCTTGGTTTTCCTTGTCTTATTTAAAAAGT
M D F G L S L V F L V L I L K S
GTACAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCC
V Q C E V Q L V E S G G L V Q P G G S
CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGAATACGAGTTCCTTCCCATGACAIGTCTTGGGTC
L R L S C A A S E Y E F P S H D M S W V
CGCCAGGCTCCGGGAAGGGGCTGGAGTTGGTCGCAGCCATTAATAGTGTGGTAGC
R Q A P G K G L E L V A A I N S D G G S
ACCTACTATCCAGACACCATGGAGAGACGATTACCCATCTCCAGAGACAAATGCCAAGAAC
T Y Y P D T M E R F T I S R D N A K N
TCACTGTACCTGCAAAATGAACAGTCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCA
S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y C A
AGACACTATGATGATTACTACGCCCTGGTTTGTCTTACTGGGGCCAAGGACTATGGTCACT
R H Y D D Y Y A W F A Y W G Q G T M V T
HindIII
GTCTCTTCAGGTGAGTCCTAACTTCAAGCTT
V S S

FIG.42

+

+

119-122 VL

NheI

SEQ ID No.24

GCTAGCACCA⁺CCATGGAGACAGACACACTCCTGTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGTTCCA
M E T D T L L L W V L L L W V P
GGTTCCACTGGTGAAATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTACCTTATCTTTGTCTCCAGGG
G S T G E I V L T Q S P A T L S L S P G
GAAAGGGCCACCCCTCTCATGCGAGGGCCAGCAAAAGTGTGAGTACATCTGGCTATAGTTAT
E R A T L S C R A S K S V S T S G Y S Y
ATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGGCTCCAGACTCCTCATCTATCTTGCAATCC
M H W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y L A S
AACCTAGAAATCTGGGTCCCTGCGAGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACC
N L E S G V P A R F S G S G S G T D F T
CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAGGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCACAGTAGG
L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q H S R
GAGCTTCGCTCACGTTGCGGAGGGACCAAGTGGAGATCAAAACGTAAGTACACTTTT
E L P L T F G G G T K V E I K

ECORI
CTGAATTC

FIG.43

+

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG OX40 VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

<130> UTFC.P1193WO

<140>

<141>

<150> 61/380,827

<151> 2010-09-08

<150> 61/375,999

<151> 2010-08-23

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 1

Asp Tyr Ser Met His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 3

Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 4
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 4
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly His Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 5
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6
 <211> 458
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp

<400> 6
 actagtagca ccatggcttg ggtgtggacc ttgctattcc tgatggcagc tgcccaaagt 60
 atccaagcac aggttcagtt ggtgcagtct ggatctgagc tgaagaagcc tggagcctca 120
 gtcaaggttt cctgcaaggc ttctggttat accttcacag actattcaat gcactgggtg 180
 cgacaggctc caggacaagg tttaaagtgg atgggctgga taaacactga gactggtgag 240
 ccaacatatg cagatgactt caagggacgg tttgtcttct ctttggacac ctctgtcagc 300
 actgcctatt tgcagatcag cagcctcaaa gctgaggaca cggctgtgta ttactgtgct 360
 aatccctact atgattacgt ctcttactat gctatggact actgggggtca gggaaccacg 420
 gtcaccgtct cctcaggtaa gaatggcctc tcaagctt 458

<210> 7
 <211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 7

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 8

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr
 1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 9

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 10

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 12

<211> 416

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

$\langle 220 \rangle$

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp

<400> 12

gctagcacca ccatggagtc acagattcag gtctttgtat tcgtgtttct ctggttgtct 60
 ggtgttgacg gagacattca gatgaccag tctccatcct ccctgtccgc atcagtggga 120
 gacagggatca ccatcacctg caaggccagt caggatgtga gtactgctgt agcctgggtat 180
 caacagaaac caggaaaagc ccctaaacta ctgatttact cggcatccta cctctacact 240
 ggagtccctt cacgcttcag tggcagtgga tctgggacgg atttcacttt caccatcagc 300
 agtctgcagc ctgaagacat tgcaacatat tactgtcagc aacattatag tactcctcgg 360
 acgttcggtc agggcaccaa gctggaaatc aaacgtaagt agaatccaaa gaattc 416

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 13
 Ser His Asp Met Ser
 1 5

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 14
 Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Glu
 1 5 10 15

Arg

<210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 15
 His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 16
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ser Asn Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
 20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Lys Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
 50 55 60

Glu Arg Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Lys Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
 20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
50 55 60

Glu Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18

<211> 451

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp

<400> 18

actagtagcca ccatggactt cgggctcagc ttggttttcc ttgtccttat tttaaaaagt 60

gtacagtgtg aggtgcagct ggtggagtct gggggaggct tagtgcagcc tggagggtcc 120

ctgagactct cctgtgcagc ctctgaatac gagttccctt cccatgacat gtcttgggtc 180

cgccaggctc cggggaaggg gctggagttg gtcgcagcca ttaatagtga tgggtggtagc 240

acctactatc cagacaccat ggagagacga ttcaccatct ccagagacaa tgccaagaac 300

tcactgtacc tgcaaatgaa cagtctgagg gccgaggaca cagccgtgta ttactgtgca 360

agacactatg atgattacta cgcctgggtt gcttactggg gccaaaggac tatggtcact 420

gtctcttcag gtgagtccta acttcaagct t 451

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 19

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15

<210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 20
 Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 21
 Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr
 1 5

<210> 22
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 22
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 23
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 23
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 24
 <211> 428
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp

<400> 24
 gctagcacca ccatggagac agacacactc ctgttatggg tactgctgct ctgggttcca 60
 ggttccactg gtgaaattgt gctgacacag tctcctgcta cttatcttt gtctccaggg 120
 gaaagggcca ccctctcatg cagggccagc aaaagtgtca gtacatctgg ctatagttat 180

atgcactggt accaacagaa accaggacag gctcccagac tcctcatcta tcttgcatcc	240
aacctagaat ctgggggtccc tgccagggttc agtggcagtg ggtctgggac agacttcacc	300
ctcaccatca gcagcctaga gcctgaggat tttgcagttt attactgtca gcacagtagg	360
gagcttccgc tcacgttcgg cggagggacc aaggtcgaga tcaaacgtaa gtacactttt	420
ctgaattc	428